

AUS DEM INSTITUT FÜR
VETERINÄR-PHYSIOLOGIE, -BIOCHEMIE,
-PHARMAKOLOGIE UND -TOXIKOLOGIE
— FACHRICHTUNG BIOCHEMIE —
IM FACHBEREICH VETERINÄRMEDIZIN DER
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

DIE ZUSAMMENSETZUNG DER PLASMALIPOPROTEINE DES HUNDES

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
EINES DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
KLAUS OLEJNICZAK
TIERARZT AUS PALENBERG

BERLIN 1984
JOURNAL-NR. 1173

AUS DEM INSTITUT FÜR
VETERINÄR-PHYSIOLOGIE, -BIOCHEMIE,
-PHARMAKOLOGIE UND -TOXIKOLOGIE
- FACHRICHTUNG BIOCHEMIE -
IM FACHBEREICH VETERINÄRMEDIZIN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

DIE ZUSAMMENSETZUNG DER
PLASMALIPOPOTEINE DES HUNDES

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

ZUR ERLANGUNG DES GRADES
EINES DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
AN DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
KLAUS OLEJNICZAK
TIERARZT AUS PALENBERG

BERLIN 1984
JOURNAL - Nr. 1173

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. H. Weik

Korreferent: Prof. Dr. M. Siegert

Tag der Promotion: 4. Mai 1984

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	Seite 5
1. Einführung	5
2. Einteilung der Lipoproteine	6
3. Stoffwechsel der Lipoproteine	10
II. MATERIAL UND METHODIK	18
1. Versuchstiere	18
2. Probenvorbereitung	18
3. Ultrazentrifugation	19
4. Dialyse und Konzentrierung	24
5. Agarose-Gel-Elektrophorese	25
6. Extraktion der Lipide	27
7. Bestimmung des gesamten und des freien Cholesterins	28
8. Bestimmung der Triacylglycerine	29
9. Bestimmung der Phospholipide	29
10. Bestimmung des Proteinanteils der Lipoproteine	30
11. Dünnschichtchromatographie	31
12. Darstellung der Fettsäurenmethylester	34
13. Gaschromatographie	35
III. ERGEBNISSE	38
1. Elektrophorese	38
2. Quantitative Bestimmung der Lipoproteine	38
3. Chemische Zusammensetzung der Lipoproteine	40
4. Zusammensetzung der Phospholipide	45
5. Gaschromatographische Analyse	48
IV. DISKUSSION	58
V. ZUSAMMENFASSUNG	69
VI. LITERATURVERZEICHNIS	73
VII. ANHANG	85

ABKÜRZUNGEN

ACAT	Acyl-Coenzym A:Cholesterin-Acyltransferase
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
CE	Cholesterinester
FC	Freies Cholesterin
HDL	High-Density-Lipoproteine
HMG-CoA	Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A
IDL	Intermediate-Density-Lipoproteine
LDL	Low-Density-Lipoproteine
LPC	Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin)
LPL	Lipoproteinlipase
NAD	Nicotinamidadeninucleotid
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
Sph	Sphingomyelin
TG	Triacylglycerin
UZR	Ultrazentrifugationsrückstand
VHDL	Very-High-Density-Lipoproteine
VLDL	Very-Low-Density-Lipoproteine
$\bar{x}$	Medianwert

I. EINLEITUNG

1. EINFÜHRUNG

Lipide können wegen ihrer Wasserunlöslichkeit im Blut nicht in freier Form transportiert werden, sondern nur in Form von Komplexen, die sie mit Proteinen bilden und die man als Lipoproteine bezeichnet. Nach der heute gültigen Vorstellung sind die Lipoproteine nach folgendem Prinzip aufgebaut: im Innern der Partikeln befindet sich ein Tropfen aus apolaren Triacylglycerinen und Cholesterinestern. Dieser apolare Kern wird durch eine monomolekulare Schicht aus amphiphilen Lipiden (Phospholipiden und freiem Cholesterin) und Proteinen, die man als Apolipoproteine bezeichnet, stabilisiert (MORRISETT u.a., 1975). Die verschiedenen Lipoproteine unterscheiden sich durch Partikelgröße, Lipidzusammensetzung, Proteinzusammensetzung und durch die Relation Lipid zu Protein.

Es gibt viele Hinweise dafür, daß die Lipoproteine des Plasmas eine besondere Rolle in der Ätiologie degenerativer vaskulärer Erkrankungen, speziell der Atherosklerose, spielen (ASSMANN, 1982). Die Atherosklerose ist eine der häufigsten Erkrankungen des Menschen mit tödlichem Ausgang (SEIDEL, 1979). Der Hund neigt spontan nicht zur Atherosklerose. Hypothyreote, cholesterinreich gefütterte Hunde zeigen jedoch von der Norm abweichende Plasmalipoproteine, teilweise atherosklerotische Gefäßwandveränderungen und sind daher von Interesse für die vergleichende Atherogeneseforschung (MAHLEY u.a., 1974; MAHLEY u.a., 1977). Primäre Hyperlipoproteinämien wurden beim Hund selten beobachtet (ROGERS u.a., 1975a; OPITZ, 1966a; WADA u.a., 1977; RODRIGUEZ und FERMIN, 1981). Sekundäre Hyperlipoproteinämien treten dagegen häufiger bei Erkrankungen wie



Diabetes mellitus (ROGERS u.a., 1975b; OPITZ, 1972; STEINER, u.a., 1975), akuter Pankreatitis (ROGERS u.a., 1975b; FORD, 1977), Hypothyreose (ROGERS, 1977; MANNING u.a., 1973; RODRIGUEZ und FERMIN, 1981), Cushing-Syndrom (OPITZ und SIEGERT, 1978) und Nephrotischem Syndrom (OPITZ, 1966b) auf.

Hypolipoproteinämien wurden in Begleitung von Malabsorptions- und Maldigestionserkrankungen beim Hund beobachtet (OPITZ und SIEGERT, 1978). Exkretorische Pankreasinsuffizienz (OPITZ und SIEGERT, 1978), Nieren- und Lebererkrankungen können ebenfalls zu ausgeprägten Hypolipoproteinämien führen (FORD, 1977).

Zum besseren Verständnis des Stoffwechsels und der Pathophysiologie der Lipoproteine ist es notwendig deren Aufbau zu kennen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Plasmalipoproteine des Hundes zu isolieren und die chemische Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen zu untersuchen.

2. EINTEILUNG DER LIPOPROTEINE

Die Lipoproteine lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte oder aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld in 4 Hauptklassen einteilen (Tabelle 1).

Die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Lipoproteinklassen beruht auf deren unterschiedlichen Lipid-/Protein-Relationen. Das spezifische Gewicht der Lipide schwankt zwischen 0,875 und 1,067 g/ml, das der Proteine zwischen 1,33 und 1,37 g/ml (HATCH und LEES, 1968).

TABELLE 1: Einteilung der Lipoproteine

ULTRAZENTRIFUGATION		ELEKTROPHORESE	
Lipoprotein	Dichte (g/ml)	Lipoprotein	Elektrophoret. Zone
Chylomikronen	0,900 - 0,940	Chylomikronen	Startpunkt
Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL)	0,940 - 1,006	Prä- β -Lipoproteine	vor β -Globulinen (mit α_2 -Globulinen)
Low-Density-Lipoproteine (LDL)	1,006 - 1,063	β -Lipoproteine	mit β -Globulinen
High-Density-Lipoproteine (HDL)	1,063 - 1,21	α -Lipoproteine	mit α -Globulinen

Dementsprechend bedingt ein hoher Lipidanteil eine niedrige Dichte und ein hoher Proteinanteil eine hohe Dichte.

Die elektrophoretische Mobilität der Lipoproteine hängt in erster Linie von der Größe ihrer Nettoladung und in geringem Maß auch von der Größe und Form der Lipoproteinpartikeln ab. Als Bezugsgröße für die Zuordnung zu einer Klasse dient die Mobilität der Globuline.

Die Apolipoproteine, die zum großen Teil in der Leber und zum kleinen Teil in den Mukosazellen des Dünndarms synthetisiert werden, sind amphiphile Proteine. Ihre hydrophoben Bezirke treten mit den apolaren Lipiden der Lipoproteine in Wechselwirkung; ihre hydrophilen Bezirke treten teils mit Phospholipiden, teils mit dem wässrigen Medium, das die Lipoproteine umgibt, in Wechselwirkung. Auf diese Weise sind die Apolipoproteine am Zustandekommen und an der Aufrechterhaltung der Struktur der Lipoproteinpartikeln beteiligt (SCANU und LANDSBERGER, 1980). Darüber hinaus erfüllen die Apolipoproteine noch andere Aufgaben, die heute sicher nur zum Teil bekannt sind: Apolipoproteine sind verantwortlich für die Bindung von Lipoproteinen an Rezeptoren der Zellen, von denen sie aufgenommen werden. Außerdem fungieren Apolipoproteine als Aktivatoren und wahrscheinlich auch als Inhibitoren von Plasmaenzymen, die im Stoffwechsel der Lipoproteine eine wichtige Rolle spielen.

Nach ihrem Vorkommen in den verschiedenen Lipoproteinklassen werden Apolipoproteine in Familien und Subfamilien eingeteilt. In den Tabellen 2 und 3 sind die Apolipoproteine, ihr Vorkommen in den Lipoproteinen und, soweit sie bekannt sind, ihre Funktionen aufgelistet.

TABELLE 2 VORKOMMEN DER APOLIPOPROTEINE

	Chylo- mikronen	VLDL	LDL	HDL
In hohen Konzen- trationen vor- kommende Apolipo- proteine	Apo A-I Apo B Apo C	Apo B Apo C-I Apo C-II Apo C-III Apo E	Apo B	Apo A-I Apo A-II*
In geringen Konzentrationen vorkommende Apolipoproteine	Apo A-II Apo E	Apo A-I Apo A-II Apo D	Apo E Apo C Apo A-I Apo A-II	Apo C Apo D Apo E

*fehlt in den HDL₂ des Hundes (EDELSTEIN u.a. 1982)

TABELLE 3 SPEZIELLE FUNKTIONEN DER APOLIPOPROTEINE

Apolipo-
protein

- A-I Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
- B Bindung an Rezeptoren
- C-I Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase,
Hemmung der Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in
die Leberzellen
- C-II Aktivator der Lipoproteinlipase, Hemmung der Aufnah-
me von Chylomikronen-Remnants in die Leberzellen
- C-III Inhibitor der Lipoproteinlipase ? , Hemmung der Auf-
nahme von Chylomikronen-Remnants in die Leberzellen
- E Bindung an Rezeptoren

3. STOFFWECHSEL DER LIPOPROTEINE

Chylomikronen

Die Chylomikronen gehören wie die VLDL zu den triacylglycerinreichen Lipoproteinen. Ihr Triacylglycerinanteil beträgt 80-90%. Chylomikronen werden im Gegensatz zu den übrigen Lipoproteinen ausschließlich in den Mukosazellen des Dünndarms gebildet. Im glatten endoplasmatischen Retikulum der Mukosazellen werden Triacylglycerine hauptsächlich aus 2-Monoacylglycerinen und Fettsäuren, den Endprodukten der im Darmlumen stattfindenden Fettverdauung, synthetisiert. Neben 2-Monoacylglycerin können auch Glycerin-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat als Fettsäurenakzeptoren fungieren (HARM und BÜTZOW, 1980).

Der Cholesterinanteil und der Phospholipidanteil der Chylomikronen können aus der Nahrung stammen oder in der Mukosazelle neu synthetisiert werden. Die Apolipoproteine Apo A-I, A-II, A-IV und Apo B werden im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) der Mukosazellen gebildet und teilweise glykosyliert. Apo A und Apo B sind typische Bestandteile naszierender Chylomikronen, während die Apolipoproteine C und E erst später, d.h. im Blut von den HDL auf die Chylomikronen transferiert werden (GREEN und GLICKMAN, 1981). Einzelheiten über die Assoziation der Triacylglycerine mit den übrigen Lipiden und den Apolipoproteinen im ER sind nicht bekannt. Auf die Assoziation folgt der Transport der Lipoproteine zum Golgi-Apparat (STRAUSS, 1966). Dort werden an den Glykoproteinanteil die terminalen Kohlenhydratreste angeheftet und die Lipoproteine in Sekretgranula verpackt. Die Ausschleusung aus der Zelle erfolgt durch Fusion der Membran der Sekretgranula mit der Plasmamembran (Exozytose).

Chylomikronen werden lymphogen aus dem Darm abtransportiert und gelangen über den Ductus thoracicus ins Blut (MASORO, 1977).

Chylomikronen stellen die Transportform der mit der Nahrung aufgenommenen Triacylglycerine im Blut dar. Daher ist ihre Konzentration im Blut nach einer fettreichen Mahlzeit besonders hoch. Nüchternblut ist normalerweise frei von Chylomikronen, da Chylomikronen sehr schnell aus dem zirkulierenden Blut entfernt werden (MELCHIOR u.a., 1981).

Eingeleitet wird die Entfernung der Chylomikronen aus dem Blut durch die Lipoproteinlipase (LPL). Dieses Enzym ist an den Gefäßendothelien (Muskel, Fettgewebe) oder an der Plasmamembran (Leber) lokalisiert (FIELDING und FIELDING, 1980). Das Enzym wird durch Apo C-II aktiviert (FIELDING und HAVEL, 1977). Die Apolipoproteine C können zwischen HDL und Chylomikronen frei ausgetauscht werden. Zu Beginn einer alimentären Hypertriacylglycerinämie kommt es zur Übertragung der Apolipoproteine C auf die Chylomikronen und damit zu einer Aktivierung der LPL (IMAIZUMI u.a., 1978). Durch die hydrolytische Spaltung des größten Teils der Chylomikronen-Triacylglycerine durch die LPL entstehen aus den Chylomikronen triacylglycerinarme und relativ an Cholesterinestern angereicherte Restpartikeln, die man als Remnants bezeichnet (REDGRAVE, 1970). Während die bei der Lipolyse frei werdenden Fettsäuren hauptsächlich von den extrahepatischen Geweben (Fettzellen, Muskulatur) aufgenommen werden, werden die Phospholipide und die Apolipoproteine A und C auf HDL übertragen (TALL u.a., 1979; HAVEL u.a., 1973). Die Chylomikronen-Remnants werden von den membranständigen Apo E-Rezeptoren der Hepatozyten gebunden und in der Leber abgebaut (ANGELIN u.a., 1983). Von der Leber kann

Cholesterin in andere Lipoproteine eingebaut werden. Cholesterin kann jedoch auch entweder direkt, oder nachdem es zu Gallensäuren oxidiert worden ist, mit der Galle ausgeschieden werden.

Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL)

Die VLDL sind die zweite triacylglycerinreiche Lipoproteinklasse. Ihr Triacylglycerinanteil beträgt 55-70%. Die VLDL werden hauptsächlich in der Leber und zum geringeren Teil im Dünndarm synthetisiert (STEINER und ILSE, 1980; GREEN und GLICKMAN, 1981).

Man nimmt an, daß die Synthese im ER, der Transport zum Golgi-Apparat und die Sekretion der VLDL durch Hepatozyten und Mukosazellen ähnlich verlaufen wie es für die Chylomikronen beschrieben ist. Die Syntheserate wird vorwiegend durch das Angebot an freien Fettsäuren reguliert (ASSMANN und SCHMITZ, 1979). Naszierende VLDL sind wahrscheinlich frei von Apo C. Im Blut erhalten jedoch die VLDL Apolipoproteine C von den HDL (AUGUSTIN u.a., 1976). Diese Übertragung ist bedeutsam, da durch Apo C-II die Lipoproteinlipase aktiviert wird.

Die VLDL stellen die Transportform der endogenen Triacylglycerine dar.

Der Abbau der VLDL verläuft qualitativ gleich wie der Abbau der Chylomikronen. Zuerst wird durch die LPL extrahepatischer Gewebe der größte Teil der Triacylglycerine hydrolytisch gespalten und die Fettsäuren von den extrahepatischen Geweben aufgenommen. Die Hydrolyse der VLDL-Triacylglycerine geht mit einer Übertragung von freiem Cholesterin, Phospholipiden und Apolipoprotein C auf die naszierenden HDL einher,

wobei diese zu HDL werden (CHAJEK und EISENBERG, 1978). Durch den Verlust an Apo C kommt der Abbau noch vorhandener Triacylglycerine durch die Lipoproteinlipase zum Erliegen. Es entstehen die Intermediate-Density-Lipoproteine (IDL). Die Zunahme der Dichte gegenüber den VLDL wird natürlich in erster Linie durch den Verlust an Triacylglycerinen bedingt. Bei der Bildung einer IDL-Partikel aus einer VLDL-Partikel bleibt der Apo B-Anteil in vollem Umfang erhalten, d.h. der relative Anteil an Apo B nimmt zu (EISENBERG und LEVY, 1975). Auch der relative Anteil an Apo E nimmt zu, obwohl Apo E teilweise abgespalten wird. Die IDL können entweder durch die Leber aus dem strömenden Blut entfernt und abgebaut werden, oder sie können in LDL umgebaut werden. Der erste Weg dominiert bei der Ratte, der zweite beim Menschen (EISENBERG und LEVY, 1975). Der relative Anteil dieser verschiedenen Stoffwechselwege am IDL-Umsatz schlägt sich im LDL-Blutspiegel nieder. Die Ratte gehört zu den Spezies, die sich durch einen sehr niedrigen LDL-Spiegel im Blut auszeichnen. Der Mensch verkörpert das andere Extrem. Der Übergang der IDL in LDL besteht in einer weiteren Delipidierung, an der eine hepatische Lipase beteiligt ist (GROSSER u.a., 1981). Einzelheiten darüber sind nicht bekannt.

Low-Density-Lipoproteine (LDL)

Die LDL entstehen auf die geschilderte Weise aus den VLDL. Ob darüber hinaus auch der Chylomikronenabbau in geringem Maß zur LDL-Synthese beiträgt, ist nicht sicher bekannt (SCHAEFFER u.a., 1978).

Die LDL haben die Aufgabe, die extrahepatischen Gewebe mit Cholesterin zu versorgen und damit die Synthese von Membranen zu ermöglichen. LDL transportieren in der Hauptsache Cholesterinester (35-40%).

Insbesondere an Fibroblastenkulturen, aber auch an anderen extrahepatischen Geweben wie glatten Muskelzellen von Arterien wurde nachgewiesen, daß in spezialisierten Regionen der Plasmamembranen, die als "coated pits" bezeichnet werden, Rezeptoren existieren, die das Apo B der LDL zu binden vermögen (GOLDSTEIN und BROWN, 1977; GOLDSTEIN u.a., 1979). Nachdem die LDL an die Rezeptoren gebunden sind, kommt es zu einer Invagination der "coated pits" wobei sich Vesikel abschnüren, die rezeptorgebundene LDL enthalten. Diese Vesikel fusionieren mit Lysosomen unter Bildung von sekundären Lysosomen. Durch lysosomale Enzyme werden die Apolipoproteine und die Cholesterinester hydrolytisch gespalten (GOLDSTEIN u.a., 1975). Das freie Cholesterin steht dann der Zelle zur Synthese von Membranen zur Verfügung. Es greift aber auch regulierend in den Cholesterinstoffwechsel der Zelle ein (BROWN und GOLDSTEIN, 1978): Das freie Cholesterin reprimiert in der Zelle die Synthese der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), des limitierenden Enzyms der Cholesterinbiosynthese.

Im Gegensatz dazu aktiviert freies Cholesterin die Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT). Durch dieses Enzym wird ein Teil des freien Cholesterins

wieder verestert, d.h. in die Speicherform übergeführt. Schließlich hemmt freies Cholesterin die Synthese von LDL-Rezeptoren und kontrolliert auf diese Weise den Einstrom von Cholesterin in die Zelle (BROWN und GOLDSTEIN, 1975).

Patienten, deren LDL-Rezeptoren eine herabgesetzte oder überhaupt keine Bindungskapazität für LDL besitzen, haben eine stark erhöhte LDL-Konzentration im Blut (GOLDSTEIN und BROWN, 1977). Solche Patienten erkranken frühzeitig an Atherosklerose. Aus epidemiologischen Studien geht hervor, daß zwischen erhöhtem LDL-Cholesterinspiegel im Blut und koronaren Herzkrankheiten eine enge positive Korrelation existiert (ASSMANN, 1982). Im Gegensatz zu den HDL gelten LDL als "atherogen".

High-Density-Lipoproteine (HDL)

Der Entstehungsmechanismus der HDL ist nicht eindeutig geklärt. Viele Befunde sprechen dafür, daß die HDL in der Leber und im Dünndarm in Form von Vorstufen gebildet werden, die man als naszierende HDL bezeichnet (HAMILTON, 1978; GREEN u.a., 1978). Die naszierenden HDL sind bilamelläre Scheibchen: Phospholipide und freies Cholesterin bilden eine Lipiddoppelschicht. An den Rändern der Lipiddoppelschicht bedecken die amphiphilen Apolipoproteine mit ihrem apolaren Teil die Fettsäurenketten (NICOLL u.a., 1980). Alternativ wird diskutiert, daß die HDL-Vorstufen nach der hydrolytischen Spaltung der Triacylglycerine aus den amphiphilen Oberflächen-Lipiden und Apolipoproteinen der Chylomikronen und VLDL hervorgehen (TALL und SMALL, 1980).

Die Apolipoprotein-Zusammensetzung der naszierenden HDL unterscheidet sich von der Apolipoprotein-Zusammensetzung der "reifen" HDL (HAVEL, 1978). Das dominierende Apolipoprotein der naszierenden HDL ist Apo E. Daneben kommen noch Apo A-I, Apo B und Apo C vor.

Die HDL entstehen im Plasma aus den naszierenden HDL durch eine Vielzahl von Prozessen. Im Vordergrund steht die Veresterung des freien Cholesterins der naszierenden HDL durch die im Plasma vorhandene Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) (GLOMSET, 1968). Dieses von der Leber gebildete Enzym wird durch Apo A-I aktiviert (FIELDING u.a., 1972). Fettsäurendonator ist das Lecithin der naszierenden HDL. Das durch den Acyltransfer entstehende Lysolecithin löst sich ab und reichert sich im Albumin an (ALAUPOVIC u.a., 1966; PHILLIPS und WILLE, 1973). Die entstehenden Cholesterinester gelangen von der Oberfläche in das Innere der Partikeln. Durch die Veresterung des Oberflächencholesterins und den folgenden Übertritt der Cholesterinester in den apolaren Kern entsteht ein Cholesteringradient, der den Transfer von freiem Cholesterin von den Oberflächenlipiden der Chylomikronen, der VLDL und von den Zellmembranen der verschiedenen Zellen begünstigt.

Weitere Austauschprozesse, die zur Bildung der HDL aus ihren Vorstufen beitragen, sind der Transfer der Apolipoproteine Apo A-I und Apo A-II der Chylomikronen sowie des Apo C, das beim Abbau der Chylomikronen und VLDL frei wird, auf die HDL (PATSCHE u.a., 1978). Umgekehrt werden Apo E und Cholesterinester von den HDL auf die VLDL transferiert (BLUM, 1982).

Die HDL haben nach nicht gesicherten Vorstellungen die Aufgabe Cholesterin aus den Geweben, die Cholesterin weder abbauen noch ausscheiden können aufzunehmen,

mit Hilfe der LCAT zu verestern und die Cholesterines-
ter abzutransportieren. Empfängerorgan ist vor allem
die Leber, die Cholesterin direkt ausscheiden kann
oder nachdem sie es zu Gallensäuren abgebaut hat. Em-
pfängerorgane sind aber auch die Gonaden und die
Nebennierenrinde, die aus Cholesterin Steroidhormone
synthetisieren.

Mit dieser Vorstellung läßt sich die vermutete "anti-
atherogene Wirkung" der HDL gut in Einklang bringen.
Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß das
Risiko, an Atherosklerose zu erkranken beim Menschen
mit hohem HDL-Cholesterin wesentlich geringer ist
als beim Menschen mit niedrigem HDL-Cholesterin
(ASSMANN, 1982).

Leber und Dünndarm gelten als Abbaustätten der HDL.
Die Radioaktivität von injizierten markierten HDL ist
in sekundären Lysosomen der Hepatozyten konzentriert
(NAKAI und WHAYNE, 1976). Da das Ausmaß, in dem die Le-
ber in vivo am Abbau der HDL beteiligt ist, umstritten
ist, wurden auch Untersuchungen über den HDL-Abbau mit
Gewebeulturen durchgeführt (NICOLL u.a., 1980). Kul-
turen von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endo-
thelzellen vermögen ebenfalls HDL abzubauen, aller-
dings in geringerem Umfang als Hepatozytenkulturen.
Welche Bedeutung diesen Zellen in vivo für den HDL-Ka-
tabolismus zukommt, ist nicht bekannt.

II. MATERIAL UND METHODIK

1. VERSUCHSTIERE

Die Untersuchung wurde an 5 klinisch gesunden Hunden im Alter von 4-5 Jahren durchgeführt. Ein Rüde (Hund 2) und vier Hündinnen (Hund 1, 3, 4 und 5) standen zur Verfügung.

Die Tiere wurden mit Altromin¹⁾ (400 g/Tier und Tag) und PAL²⁾ (150 g/Tier und Tag) gefüttert. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Die Nüchternphase vor der Blutabnahme wurde mit 42 Stunden so gewählt, daß mit Sicherheit keine Chylomikronen mehr im Blut vorhanden waren. Im Unterschied zur Ratte (ROBINSON, 1970) und zum Pferd (WEIK und ALTMANN, 1971) steigt die Lipidkonzentration im Plasma des Hundes, auch nach einer mehrere Tage andauernden Nüchternphase, nicht an (BRUIJNE u.a., 1981; LEMIEUX und PLANTE, 1968).

2. PROBENVORBEREITUNG

Von jedem Hund wurden durch Punktion der Vena jugularis 250 ml Blut gewonnen. 0,1% Titriplex III (Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure), mit dem das Blut ungerinnbar gemacht wurde, wurde auch in allen nachfolgenden Arbeitsgängen den Lösungen und Puffern in einer Endkonzentration von 0,001% zugesetzt. Titriplex III hemmt Oxidationsprozesse, dadurch daß es mit Kationen wie Kupfer Chelate bildet (BACHORIK, 1979).

¹⁾ Altromin Spezialfutterwerke GmbH, Lage

²⁾ Effem GmbH, Verden

Zur Hemmung eines Bakterienwachstums wurde allen Versuchsansätzen Thiomersal (2-[S-(Ethylmercuri)-mercapto]benzoesäure-Na-Salz) in einer Endkonzentration von 0,001% zugesetzt (HATCH und LEES, 1968).

3. ULTRAZENTRIFUGATION

Die Zentrifugation wurde mit der Ultrazentrifuge Modell L5 65 der Fa. Beckmann durchgeführt. Das Gerät war mit dem Festwinkelrotor 50 Ti ausgestattet. Die verwendeten Quick-Seal Zentrifugenröhrchen wurden mit dem Tube sealer, Modell 25 verschweißt.

Die Lipoproteine wurden durch sequentielle Ultrazentrifugation gewonnen: In mehreren aufeinander folgenden Zentrifugationsgängen wurde jeweils die Dichte des Suspensionsmediums erhöht, wobei mit jeder Erhöhung der Dichte die Lipoproteine der nächst höheren Dichteklasse an die Oberfläche flotierten und von dort abgenommen werden konnten. Entsprechend der Klassifizierung auf Seite 7 mußten die folgenden Dichten in den Suspensionsmedien eingestellt werden: 1,006, 1,063 und 1,21 g/ml.

Die Dichte von 1,006 g/ml entspricht der Dichte des Plasmas.

Die Dichte von 1,063 g/ml wurde dadurch eingestellt, daß zwei Stammlösungen von Natriumchlorid und Natriumbromid mit den Dichten 1,006 g/ml und 1,346 g/ml miteinander gemischt wurden.

Zur Herstellung der Stammlösung wurden Natriumchlorid und Natriumbromid 8 Stunden bei 550°C im Muffelofen geglüht und im Exsikkator über Blaugel bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Stammlösung 1 (d= 1,006 g/ml)

8,7664 g NaCl

0,1 g Titriplex III

0,1 g Thiomersal

wurden in destilliertem Wasser gelöst,
mit 0,1 n NaOH auf pH 7,4 eingestellt und
auf 1 l aufgefüllt.

Stammlösung 2 (d= 1,346 g/ml)

153,0 g NaCl

354,0 g KBr

0,1 g Titriplex III

0,1 g Thiomersal

wurden in destilliertem Wasser gelöst (Lösungsvor-
gang dauert ca. 24 Stunden), mit 0,1 n NaOH auf
pH 7,4 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

Die Suspensionslösung mit der gewünschten Dichte wurde nach der folgenden Formel hergestellt (HAVEL u.a., 1955):

$$A \times 1,006 + B \times 1,346 = (A+B)X$$

A: Volumen (Dichte 1,006 g/ml)

B: Volumen (Dichte 1,346 g/ml)

X: Gewünschte Dichte

Die Dichte 1,21 g/ml, bei der die HDL₂-Fraktion flo-
tiert, wurde durch den Zusatz von festem Kaliumbromid
nach der folgenden Formel eingestellt
(HATCH und LEES, 1968):

$$X = \frac{V_i(df - d_i)}{1 - \bar{V} df}$$

V_i: Ausgangsvolumen

df: Einzustellende Dichte

d_i: Ausgangsdichte

$\bar{V}$: Ausdehnungskoeffizient
von Kaliumbromid (0,298)

Die Zentrifugation wurde nach dem Schema auf
Seite 22 durchgeführt.

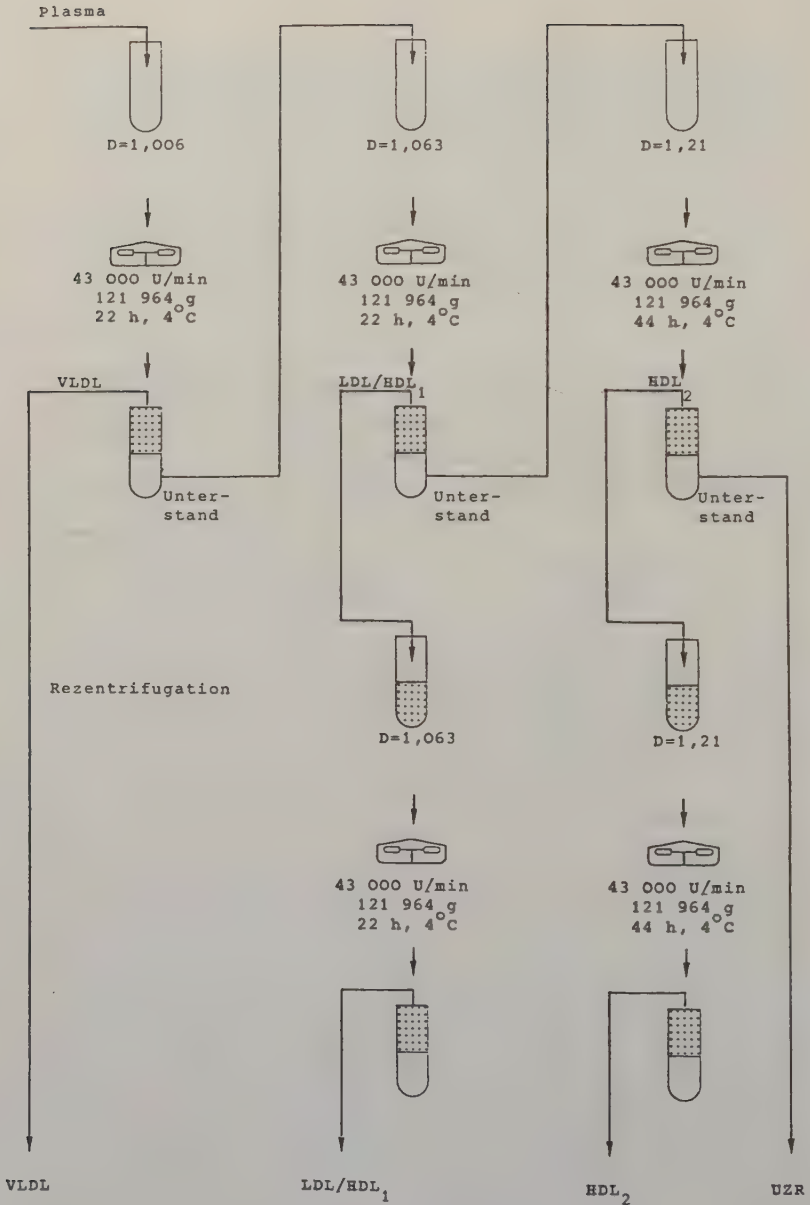


Abb. 1: Zentrifugationsschema

Ein "Wascheffekt" sollte bei der Zentrifugation dadurch erzielt werden, daß die Zentrifugenröhrchen nur zu 80% mit Plasma oder Lipoproteinlösungen gefüllt und diese dann mit der Salzlösung der gleichen Dichte überschichtet wurden.

Um möglichst reine Fraktionen zu erhalten, wurden die LDL/HDL₁- und die HDL₂-Fraktionen rezentrifugiert. Die Bremse der Ultrazentrifuge blieb ausgeschaltet, damit ein erschütterungsfreies Auslaufen gewährleistet war.

Nach der Zentrifugation wurden die Kappen der Zentrifugenröhrchen mit einem Skalpell abgeschnitten und die Zentrifugenröhrchen in einen Laserstrahl gestellt. Durch den dabei auftretenden Tyndall-Effekt wurden die Lipoproteine sichtbar gemacht (LINDGREN u.a., 1964). Die an die Flüssigkeitsoberfläche flotierten Lipoproteine wurden mit einer Spritze abgesaugt (DE LALLA und GOFMAN, 1954).

Der Unterstand wurde auf die nächst höhere Dichte eingestellt und entsprechend dem Schema weiter zentrifugiert. Der Unterstand, der bei der Dichte 1,21 g/ml gewonnen wurde, wurde anschließend der gleichen Lipidanalyse unterzogen wie die flotierten Lipoproteine. Er wird im folgenden als Ultrazentrifugationsrückstand (UZR) bezeichnet. Der UZR enthält Lipoproteine mit einer Dichte $> 1,21$ g/ml und erhält deshalb von manchen Autoren die Bezeichnung Very-High-Density-Lipoproteine (VHDL) (ALAUPOVIC u.a., 1966). Da in dieser Fraktion neben den VHDL vor allem Albumin und Globuline enthalten sind, ist die Bezeichnung "VHDL" für die Gesamtfraktion unzutreffend.

4. DIALYSE UND KONZENTRIERUNG

Die LDL/HDL₁- und HDL₂-Fraktionen wurden gegen 5 Liter physiologische Natriumchloridlösung, pH 7,4, 48 Stunden bei 8°C dialysiert. Die Lösung wurde 3 mal gewechselt. Die Dialyseschläuche wurden vor ihrer Benutzung in Titrifix III-haltigem, destilliertem Wasser ausgekocht und mit destilliertem Wasser nachgewaschen.

Für die Durchführung chemischer Analysen und für die elektrophoretische Auftrennung war es erforderlich, die VLDL- und die LDL/HDL₁-Fraktionen nach der Dialyse zu konzentrieren. Zur Konzentrierung wurde das von SIEGERT und BIENEK (1969) entwickelte Ultrafiltrationsgerät benutzt (Abbildung 2).

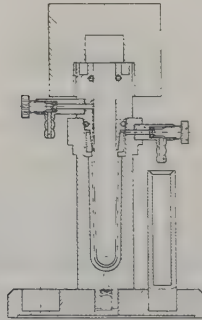


Abbildung 2: Ultrafiltrationsgerät

5. AGAROSE-GEL-ELEKTROPHORESE

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden die einzelnen, durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen auf ihre Reinheit überprüft. Außerdem wurden die LDL und die HDL₁, die in der Ultrazentrifugation bei einer Dichte von 1,063 g/ml gemeinsam flotierten durch präparative Agarose-Gel-Elektrophorese als Einzelfraktionen gewonnen.

Die Elektrophorese wurde in einer mit Petroläther gekühlten Kammer durchgeführt, die sich dadurch auszeichnete, daß der Barbitalpuffer permanent zirkulierte. Auf diese Weise lagen im Anoden- und Kathodenraum identische Pufferkonzentrationen vor.

Der Barbitol-Puffer wies die folgende Zusammensetzung auf:

9,86 g Barbitol-Na
1,55 g Barbitol
Aqua dest. ad 1000 ml

Agarose (Sea Kem -0,17 mr EEO)¹⁾ wurde in einer Konzentration von 1,2% in Barbitalpuffer im kochenden Wasserbad gelöst und anschließend auf 56°C abgekühlt. Mit dem Agarosegel wurden Objektträger beschichtet. Für die Überprüfung der Reinheit der Fraktionen betrug die Schichtdicke 1 mm, für die präparative Elektrophorese der LDL- und HDL₁-Fraktionen 10 mm.

¹⁾ Fa. Marine Colloid Division, FMC Corp. Rockland, Maine, USA

An der Auftragsstelle wurde aus dem 1 mm dicken Agarosegel ein 10 mm langer und 1 mm breiter, aus dem 10 mm dicken Agarosegel ein 10 mm langer und 3 mm breiter Streifen herausgestanzt. In den entstandenen Schlitz wurden die zu trennenden Lipoproteine, nachdem sie zuvor mit Agaroselösung (48°C) im Verhältnis 1:1, gemischt worden waren, pipettiert.

Die Elektrophorese wurden unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 200 V, 110 mA, 10°C , 70 min.

Im Anschluß an die präparative Elektrophorese wurden die getrennten LDL- und HDL₁-Fraktionen im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit dem Spatel herausgeschnitten (MAHLEY und WEISGRABER, 1974). Die anderen Agaroseträger wurden 60 Minuten in 6%iger Essigsäure fixiert, 5 Stunden durch Wässern entsalzt und über Nacht bei 45°C getrocknet. Dann wurden die Agaroseträger 35 Minuten ins Färbepad (0,5% Amidoschwarz in 5% Essigsäure) gelegt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch zweimaliges Waschen mit 2% Essigsäure (10 Minuten und 25 Minuten) entfernt.

Die Extinktion der einzelnen Banden wurde im Zeiss Chromatogramm-Spektrophotometer gemessen und mit dem W&W Extinktionsschreiber, Type 3212 aufgezeichnet. Die Peakflächen der getrennten LDL- und HDL₁-Fraktionen wurden mit dem halbautomatischen Bildanalysensystem M.O.P. der Firma Kontron ermittelt. Damit konnte der Proteingehalt der LDL- und der HDL₁-Fraktionen aus der Gesamtproteinmenge, der bei 1,063 g/ml gemeinsam flotierten LDL/HDL₁, berechnet werden.

6. EXTRAKTION DER LIPIDE

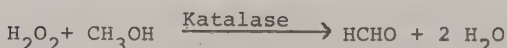
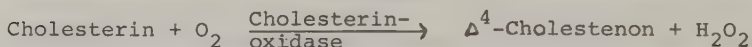
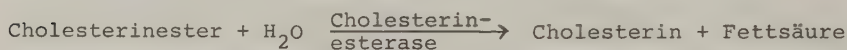
Die Fraktionen VLDL, HDL₂ und der Ultrazentrifugationsrückstand wurden dreimal jeweils mit der zwanzigfachen Menge Chloroform/Methanol 2:1 (V/V) extrahiert. Zur Reinigung wurden die vereinigten Rohextrakte mit Wasser versetzt ($\frac{1}{5}$ ihres Volumens). Das ursprünglich einphasige System trennte sich dadurch in zwei Phasen: in die lipidhaltige Chloroformphase und in die Methanol-Wasser-Phase, die verworfen wurde (FOLCH u.a., 1957).

Die durch präparative Elektrophorese gewonnenen LDL- und HDL₁-Fraktionen wurden aus der Agarose erst extrahiert, nachdem Barbital und Barbital-Natrium durch Dialyse gegen physiologische Natriumchlorid-Lösung aus der Agarose entfernt worden waren. Diese Reinigung hatte sich als erforderlich erwiesen, da Barbital die dünnschichtchromatographische Trennung der Lipide störte. Nach der Dialyse wurde die Agarose lyophilisiert und zur Extraktion der Lipide mit Chloroform/Methanol 2:1 (V/V) homogenisiert (PHILLIPS und WILLE, 1973). Der Extraktionsvorgang wurde zweimal wiederholt und die vereinigten Lipidrohextrakte gereinigt wie oben beschrieben. Auf eine weitere Reinigung der Lipidextrakte mit Wasser oder Salzlösungen wurde verzichtet, da Verluste an polaren Phospholipiden zu befürchten waren (NELSON, 1975). Die Lipidextrakte wurden im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Anschließend wurden die Lipide in Chloroform aufgenommen und unter Stickstoff bei -40°C aufbewahrt.

7. BESTIMMUNG DES GESAMTEN UND DES FREIEN CHOLESTERINS

Das Gesamtcholesterin, der mit der Ultrazentrifugation getrennten Lipoproteinfraktionen, wurde mit einer "Test-Combination" der Fa. Boehringer Mannheim nach der sogenannten Katalase-Methode bestimmt.

Reaktionsprinzip:



Der entstandene Farbstoff wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen.

Zur Bestimmung des freien Cholesterins wurde die gleiche "Test-Combination", jedoch ohne das Enzym Cholesterinesterase, eingesetzt.

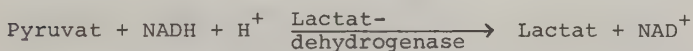
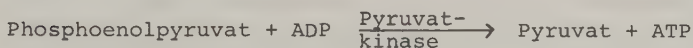
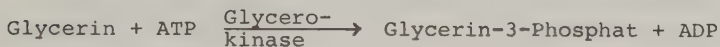
Die Werte für Cholesterinester ergaben sich aus der Differenz zwischen Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin, multipliziert mit dem Faktor 1,67. Wenn Cholesterin im Lipidextrakt bestimmt werden sollte, wurde zunächst das Chloroform abgedampft und der Lipidrückstand in einer Mischung aus Hydroxypolyäthoxydodecan/Propanol-1, 1:1 (V/V) gelöst (RÖSCHLAU u.a., 1974). Ein aliquoter Teil davon wurde wie oben beschrieben zur Cholesterinbestimmung eingesetzt.

8. BESTIMMUNG DER TRIACYLGLYCERINE

Die Triacylglycerine wurden ebenfalls mit einer "Test-Combination" der Fa. Boehringer Mannheim bestimmt.

Reaktionsprinzip:

Die Triacylglycerine werden mit äthanolischer KOH verseift. Das freigesetzte Glycerin wird enzymatisch bestimmt.



Die verbrauchte Menge NADH ist der Glycerinmenge äquivalent. Die NADH-Abnahme kann bei einer Wellenlänge von 365 nm im Photometer gemessen werden.

9. BESTIMMUNG DER PHOSPHOLIPIDE

Als Meßgröße für die quantitative Erfassung der Phospholipide diente der Lipid-Phosphor (DUCK-CHONG, 1979). Wegen der Empfindlichkeit der Methode mußten alle Glasgeräte über Nacht in konzentrierter Schwefelsäure, die 5% Salpetersäure enthielt, gereinigt werden. Die Reagenzien wurden in Plastikgefäßen aufbewahrt.

Die Lipide wurden über einer Bunsenflamme mit Magnesiumnitrat erhitzt. Dadurch wurde der Lipidphosphor in anorganisches Phosphat übergeführt. Der Rückstand wurden in 1 normaler Salzsäure bei 95°C gelöst und mit Ammoniummolybdat-Malachitgrün unter Zusatz von Triton X 100 versetzt. Es entstand ein blauer Farbstoff, dessen Intensität dem Phosphorgehalt proportional war. Die Extinktion wurde in einem Zeiss-Photometer M4 QIII bei 650 nm gemessen.

Berechnung des Phospholipidgehaltes (ZAHLER, 1967):

Lipidphosphor x 25,0 = Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (Sph), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE).

Lipidphosphor x 16,7 = Lysophosphatidylcholin (LPC).

10. BESTIMMUNG DES PROTEINANTEILS

Die Proteine wurden nach der von PETERSON (1977) modifizierten Lowry-Methode bestimmt. Die Methode beruht auf zwei Farbreaktionen: 1. der Biuret-Reaktion und 2. der Reduktion von Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure durch Tyrosin- und Tryptophanreste der Proteine. Der entstandene Farbstoff wurde im Zeiss-Photometer M4 QIII bei 750 nm gemessen. Als Standard diente Rinderalbumin.

11. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Dünnschichtchromatographie diente einmal der Abtrennung der Phospholipide von den Neutralfetten, zum anderen der weiteren Fraktionierung der Neutralfette und Phospholipide in die Einzelfractionen.

Für die Abtrennung der Phospholipide von den Neutralfetten und für die weitere Auftrennung der Neutralfette wurden Glasplatten, 20 cm x 20 cm, mit Hilfe des Beschichtungsautomaten 21 602 der Fa. Camag, mit Kieselgel HR (Fa. Merck) beschichtet. Die Schichtdicke betrug 0,5 mm.

Für die Fraktionierung der Phospholipide wurden Dünnschichtchromatographie-Fertigplatten (Fa. Merck), 10 cm x 20 cm, Kieselgel 60 mit Konzentrationszone und einer Schichtdicke von 0,2 mm verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden sämtliche Dünnschichtplatten zur Reinigung 3 1/2 Stunden in Chromatographiekammern gestellt, die als Fließmittel Chloroform/Methanol/Eisessig/ Wasser (50:25:7:3, V/V/V/V) enthielten. Die Kieselgelfront, in der Verunreinigungen angereichert waren, wurde in einer Breite von 0,5 cm abgekratzt. Die mit Kieselgel HR beschichteten Platten wurden vor der Auftragung des Lipidextraktes um 90° gedreht. Zur Aktivierung wurden alle Platten 1 Stunde bei 110°C getrocknet und anschließend im Exsikkator aufbewahrt. Die Lipidextrakte wurden mit ausgezogenen Pasteur-Pipetten auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

Nach der Entwicklung wurden die Platten mit einer methanolischen Lösung von Dichlorfluoreszein (PARKER und PETERSON, 1965) besprüht. Dadurch wurden die Lipidflecken im UV-Licht (350 nm) sichtbar und konnten abgekratzt werden. Die einzelnen Lipide wurden anhand von dünnschichtchromatographisch reinen Testsubstanzen¹⁾ identifiziert.

Für die Abtrennung der Neutrallipide von den Phospholipiden wurde das Fließmittel Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (30:70:1, V/V/V) verwendet. Die Entwicklungsdauer betrug ca. 40 Minuten. Die Neutrallipide wurden aus dem abgekratzten Kieselgel mit Chloroform/Methanol (2:1, V/V) extrahiert, die Phospholipide mit Chloroform/Methanol (1:1, V/V), das 10% Wasser enthielt (CHRISTIE, 1973).

Triacylglycerine und Cholesterinester, die unter den oben angegebenen Bedingungen einen einheitlichen Fleck bildeten, wurden in dem Fließmittel Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (90:10:1, V/V/V) 50 Minuten rechromatographiert und getrennt. Die Phospholipide wurden 2¹/₂ Stunden in dem Fließmittel Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (50:25:7:3, V/V/V/V) chromatographiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung einer Phospholipid-Testmischung zeigt Abbildung 3.

¹⁾ Fa. Applied Science, Laboratories, State College,
Pa. USA und
Fa. Supelco Inc. Bellefonte, Pa. USA

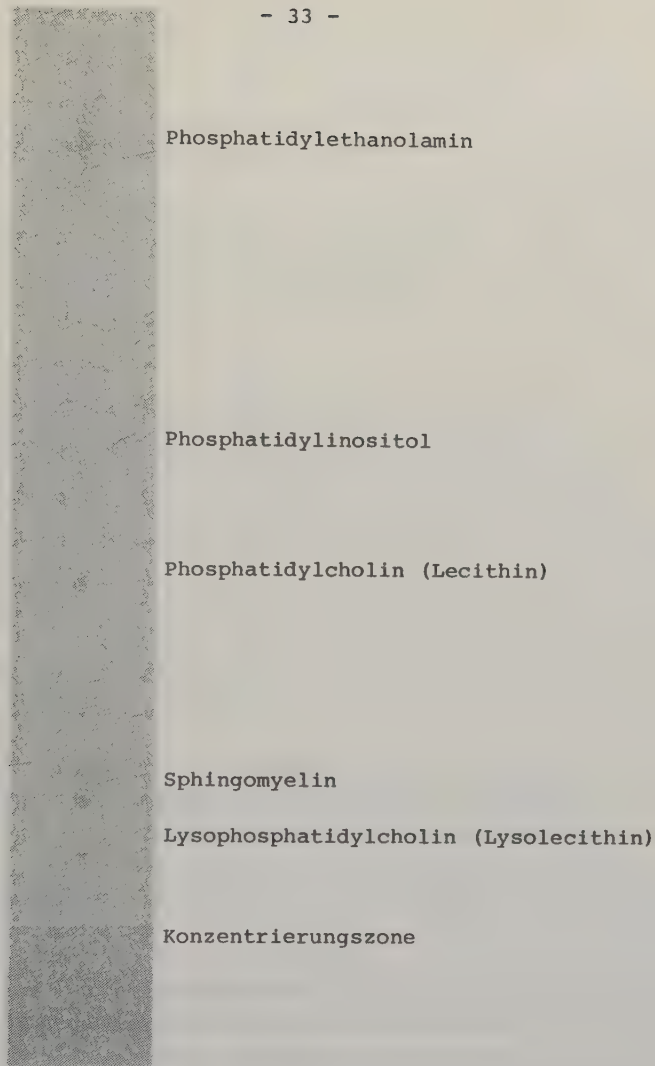


ABBILDUNG 3: DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG
EINER PHOSPHOLIPID-TESTMISCHUNG

Sprühreagenz: Dittmer-Lester-Reagenz
modifiziert nach RYU und MAC COSS (1979)

Fließmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser
(50:25:7:3, V/V/V/V)

Entwicklungszeit: 2¹/₂ Stunden

12. DARSTELLUNG DER FETTSÄURENMETHYLESTER

Die in den Triacylglycerinen und Phospholipiden -mit Ausnahme des Sphingomyelins- gebundenen Fettsäuren wurden mit 0,5 M Natriummethylat in Methanol/Benzol (6:4, V/V) innerhalb von 2 Minuten bei Raumtemperatur umgeestert (GLASS, 1971).

Zur Darstellung der Fettsäurenmethylester aus Cholesterinestern, wurden die Cholesterinester ebenfalls bei Raumtemperatur mit 1 M Natriummethylat in Methanol/Benzol (6:4, V/V) versetzt. Während der Einwirkungszeit von 1 Stunde entstehen neben den Methylestern zum Teil auch die Natrium-Seifen der Fettsäuren. Diese wurden mit methanolischer Schwefelsäure in einer Endkonzentration von 0,1 M bei einer Temperatur von 45°C und einer Einwirkungsdauer von 1 Stunde ebenfalls in die Methylester übergeführt (TUCKEY und STEVENSON, 1979).

Sphingomyeline wurden 5 Stunden lang mit 2 M methanolischer Salzsäure am Rückflußkühler gekocht zur Überführung der säureamidartig gebundenen Fettsäuren in die Methylester (KATES, 1964). Die Fettsäurenmethylester wurden mit Petroläther aus dem jeweiligen Reaktionsgemisch extrahiert.

Bei der Extraktion der Fettsäurenmethylester, die aus den Cholesterinestern gebildet wurden, wurde ein Teil des freien Cholesterins mitextrahiert. Da das freie Cholesterin die gaschromatographische Analyse der Fettsäurenmethylester gestört hätte, wurde das freie Cholesterin dünnschichtchromatographisch auf den bereits beschriebenen Kieselgel-HR-Platten entfernt. Das Fließmittel war Petroläther/Diäthyläther/Eisessig (30:70:1, V/V/V). Die isolierten Fettsäurenmethylester wurden mit Petroläther aus dem Kieselgel extrahiert.

13. GASCHROMATOGRAPHIE

Für die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäurenmethylester wurde der mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattete Gaschromatograph, Modell 2700, der Firma Varian Aerograph verwendet.

Die meisten Fettsäurenproben wurden auf zwei verschiedenen Säulen chromatographiert, deren stationäre Phasen sich in ihren Polaritäten und damit in ihren Trenneigenschaften deutlich unterschieden. Auf diese Weise sollte die falsche Zuordnung unbekannter Banden zu einer Fettsäure, die auf einer der beiden Säulen zufällig die gleiche Retentionszeit hatte, vermieden werden. Diese zusätzliche Absicherung war erforderlich, da die Identifizierung der einzelnen Fettsäuren durch Cochromatographie mit gaschromatographisch reinen Referenzsubstanzen¹⁾ erfolgte.

Die Fettsäurenmethylester der Testmischung sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

¹⁾ Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg;
Fa. Merck, Darmstadt und
Fa. Supelco Inc., Bellefonte, P.A., USA

TABELLE 4

FETTSÄUREN DER TESTMISCHUNG (als Methylester)

Kurz- bezeichnung	systematische Bezeichnung	Trivial- bezeichnung
12:0	Dodecansäure	Laurinsäure
14:0	Tetradecansäure	Myristinsäure
16:0	Hexadecansäure	Palmitinsäure
16:1, ω -7	Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
17:0	Heptadecansäure	Margarinsäure
18:0	Octadecansäure	Stearinsäure
18:1, ω -9	Octadecensäure	Ölsäure
18:2, ω -6	Octadecadiensäure	Linolsäure
18:3, ω -3	Octadecatriensäure	Linolensäure
20:0	Eicosansäure	Arachidinsäure
20:1, ω -9	Eicosensäure	Gadoleinsäure
20:4, ω -6	Eicosatetraensäure	Arachidonsäure
20:5, ω -3	Eicosapentaensäure	Timnodonsäure
22:0	Docosansäure	Behensäure
22:5, ω -3	Docosapentaensäure	---
22:6, ω -3	Docosahexaensäure	Clupanodonsäure
23:0	Tricosansäure	---
24:0	Tetracosansäure	Lignocerinsäure
24:1, ω -9	Tetracosensäure	Nervonsäure

Die Gaschromatographie wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- A: Stationäre Phase - 10% EGSS-X auf Gaschrom-P¹⁾
125-150 mesh
- Säulenlänge - 2 m
- Säulendurchmesser - 1/8 Zoll
- Trägergas - Stickstoff 10 ml/min Säule 195°C
Wasserstoff 21 ml/min Injektor 300°C
Luft 250 ml/min Detektor 250°C
- B: Stationäre Phase - Silar 10 C auf Gaschrom-Q¹⁾
100-120 mesh
- Säulenlänge - 3 m
- Säulendurchmesser - 1/8 Zoll
- Trägergas - Stickstoff 10 ml/min Säule 210°C
Wasserstoff 21 ml/min Injektor 300°C
Luft 250 ml/min Detektor 250°C

Die Peakflächen wurden nach BALL und HARRIS (1968) ermittelt: Peakhöhe x Peakbreite in der halben Höhe. Damit konnten die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäurenpeaks an der Gesamtpeakfläche errechnet werden. Da die verschiedenen Fettsäurenmethylester vom Gaschromatographen unterschiedlich empfindlich angezeigt werden, mußten die Flächenprozente mit Hilfe von Korrekturfaktoren in Gewichtsprozente umgerechnet werden. Die Korrekturfaktoren waren zuvor für die einzelnen Fettsäuren experimentell ermittelt worden (KAISER, 1964).

¹⁾ Fa. Applied Science, Laboratories, State College, P.A., USA

III. ERGEBNISSE

1. ELEKTROPHORESE

In der Abbildung 4 sind die Pherogramme mit den dazugehörigen Extinktionskurven der Plasmaproteine und der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Lipoproteinfraktionen dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß die durch Ultrazentrifugation gewonnenen VLDL- und HDL₂-Fraktionen elektrophoretisch rein sind. Die Lipoproteine, die bei einer Dichte von 1,063 g/ml flotierten, stellen sich in der Elektrophorese als zwei Fraktionen dar: LDL und HDL₁. Wie im Kapitel "Methodik" beschrieben, wurden diese beiden Fraktionen durch die präparative Gelelektrophorese getrennt.

2. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER LIPOPROTEINE

In den folgenden Tabellen sind die ermittelten Einzelwerte und die Medianwerte ($\tilde{x}$) aufgeführt. Ordnet man eine Stichprobe der Größe nach, so ist der Medianwert der mittlere Wert, wenn eine ungerade Zahl von Beobachtungen vorliegt. Er ist das arithmetische Mittel der beiden mittleren Werte, wenn eine gerade Anzahl von Beobachtungen vorliegt.

In der Tabelle 5 sind die Konzentrationen der einzelnen Lipoproteinfraktionen und der Gesamtlipoproteine aufgeführt. Der Anteil der HDL₂-Fraktionen an den Gesamtlipoproteinen ist extrem hoch. Er beträgt 94%. Die Plasmalipoproteinkonzentration variiert stark. Bei den 5 untersuchten Hunden wurden die Extremwerte 623 und 1145 mg/100 ml Plasma ermittelt.

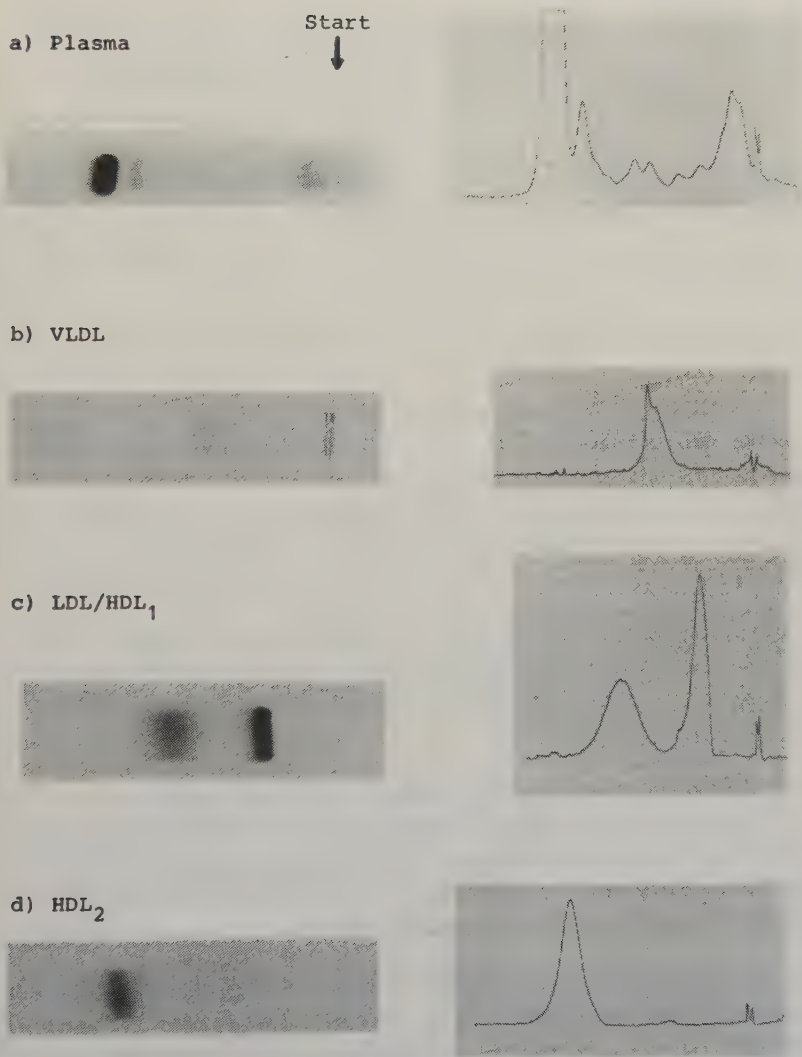


ABBILDUNG 4: ELEKTROPHORESE DER PLASMAPROTEINE (a) UND DER DURCH ULTRAZENTRIFUGATION ISOLIERTEN LIPOPROTEINE (b bis d)

Der Ultrazentrifugationsrückstand ist in Tabelle 5 nicht aufgeführt, da im Ultrazentrifugationsrückstand nur der Lipidanteil experimentell bestimmt worden ist. Eine Ermittlung des Proteinanteils des Ultrazentrifugationsrückstandes wäre nicht sinnvoll, da Albumin und Globuline mit erfaßt werden würden.

3. CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINE

Die VLDL, deren Zusammensetzung in der Tabelle 6 aufgeführt ist, bestehen zu 12% aus Proteinen und zu ca. 88% aus Lipiden. Unter den Lipiden dominieren die Triacylglycerine mit 69%. VLDL werden zusammen mit den Chylomikronen zu den triacylglycerinreichen Lipoproteinen gerechnet.

Die Zusammensetzung der LDL wird in Tabelle 7 wiedergegeben. Die Hauptfraktion sind die Triacylglycerine mit 36%. LDL enthalten einen höheren Proteinanteil (21%) als die VLDL.

Der Proteingehalt der HDL₁ (Tabelle 8) unterscheidet sich nur wenig von dem der LDL. Dagegen unterscheiden sich die beiden Fraktionen im Lipidmuster erheblich. Die HDL₁ sind arm an Triacylglycerinen (2%) und reich an Cholesterinestern und Phospholipiden.

In den HDL₂ (Tabelle 9) dominiert der Proteinanteil (47%). Triacylglycerine treten nur noch in Spuren auf. Die quantitativ wichtigsten Lipide sind die Phospholipide, gefolgt von den Cholesterinestern.

TABELLE 5
VERTEILUNGSMUSTER DER PLASMALIPOPROTEINE

	Hund 1		Hund 2		Hund 3		Hund 4		Hund 5		$\bar{X}$	
	mg ¹⁾	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
VLDL	9	1,4	7	0,8	12	1,8	10	1,5	10	0,9	10	1,5
LDL	8	1,3	17	1,9	15	2,3	4	0,6	8	0,7	8	1,2
HDL ₁	6	1,0	22	2,5	24	3,7	11	1,6	25	2,2	22	3,2
HDL ₂	600	96,3	833	94,8	601	92,2	645	96,3	1102	96,2	645	94,2
Σ	623		879		652		670		1145		685	

1) mg/100 ml Plasma

TABELLE 6
CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER VLDL

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Cholesterinester	2,8	2,4	2,6	3,9	2,9	2,8
Freies Cholesterin	3,6	4,3	3,4	3,3	4,1	3,6
Triacylglycerine	75,0	68,0	68,4	68,8	68,9	68,8
Phospholipide	8,5	12,6	13,0	11,6	12,3	12,3
Protein	10,0	12,6	12,7	12,4	11,9	12,4

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 7
CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER LDL

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Cholesterinester	10,0	13,7	13,4	11,6	12,6	12,6
Freies Cholesterin	7,9	8,7	7,2	8,6	8,2	8,2
Triacylglycerine	36,4	38,7	35,6	38,2	36,3	36,4
Phospholipide	25,0	21,4	19,0	19,9	22,3	21,4
Protein	20,7	17,5	24,8	21,7	20,6	20,7

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 8

CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER HDL₁

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Cholesterinester	27,1	30,7	40,0	29,8	32,3	30,7
Freies Cholesterin	8,8	10,7	7,2	10,5	14,9	10,5
Triacylglycerine	2,2	2,9	2,2	1,6	1,2	2,2
Phospholipide	35,2	31,0	27,5	34,5	29,2	31,0
Protein	26,8	24,8	23,0	23,6	22,4	23,6

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 9

CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DER HDL₂

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Cholesterinester	18,2	21,9	16,5	18,0	19,2	18,2
Freies Cholesterin	3,0	3,8	2,8	3,0	3,1	3,0
Triacylglycerine	0,5	0,4	1,3	0,4	0,4	0,4
Phospholipide	33,1	26,9	28,9	31,9	32,4	31,9
Protein	45,3	47,0	50,6	46,7	44,9	46,7

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 10

LIPIDMUSTER DES ULTRAZENTRIFUGATIONSRÜCKSTANDES

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Cholesterinester	36,3	16,2	36,5	27,8	12,3	27,8
Freies Cholesterin	4,0	1,4	4,9	2,8	1,1	2,8
Triacylglycerine	5,3	6,5	8,2	4,6	3,9	5,3
Phospholipide	57,3	31,3	79,8	53,5	43,3	53,5

Angaben in mg/100 ml Plasma

Tabelle 10 enthält das Lipidmuster des Ultrazentrifugationsrückstandes. Da aus den bereits erwähnten Gründen keine Proteinbestimmung durchgeführt wurde, können die angegebenen Werte nicht mit denen der vorangegangenen Tabellen verglichen werden. Lediglich die Aussage, daß der Ultrazentrifugationsrückstand an Lipiden, vor allem Phospholipide und Cholesterinester enthält, ist möglich.

Tabelle 11 zeigt die Verteilung der Lipide auf die Lipoproteine des Plasmas. 74% der im Plasma in Form von Lipoproteinen vorhandenen Lipide sind Bestandteil der HDL₂-Fraktion, 19% sind Bestandteil des Ultrazentrifugationsrückstandes. Die restlichen 7% verteilen sich auf die Fraktionen VLDL, LDL und HDL₁.

Damit die von mir ermittelten Werte mit Literaturwerten verglichen werden können, wurde der prozentuale Anteil des Estercholesterins am Gesamtcholesterin (Spalte 1) und das Verhältnis Cholesterinester zu freiem Cholesterin (Spalte 2) errechnet und in der Tabelle 12 aufgelistet.

Die Tabelle zeigt, daß mit zunehmender Dichte der Lipoproteine der Anteil des Estercholesterins am Gesamtcholesterin von 31 auf 86% ansteigt. Dementsprechend steigt der Quotient Cholesterinester zu freiem Cholesterin von ca. 0,8 bei den VLDL auf ca. 10,2 beim Ultrazentrifugationsrückstand.

TABELLE 11

VERTEILUNG DER LIPIDE AUF DIE LIPOPROTEINE DES PLASMAS

	Hund 1		Hund 2		Hund 3		Hund 4		Hund 5		$\bar{X}$	
	mg ^x	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
VLDL	8	1,8	6	1,1	10	2,1	8	1,8	9	1,3	8	1,7
LDL	7	1,6	14	2,6	11	2,4	3	0,7	6	0,9	7	1,5
HDL ₁	5	1,1	19	3,5	19	4,1	9	2,0	19	2,7	19	4,1
HDL ₂	328	72,7	442	82,5	297	63,7	344	75,9	607	86,5	344	73,7
UZR	103	22,8	55	10,3	129	27,7	89	19,6	61	8,7	89	19,0
Σ	451		536		466		453		702		467	

^x mg Lipid/100 ml Plasma

TABELLE 12

VERHÄLTNIS: $\frac{\text{ESTERCHOLESTERIN} \times 100}{\text{GESAMTCHOLESTERIN}}$ (1) $\frac{\text{CHOLESTERINESTER}}{\text{FREIES CHOLESTERIN}}$ (2)

	Hund 1		Hund 2		Hund 3		Hund 4		Hund 5		$\bar{X}$	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
VLDL	32	0,8	25	0,6	31	0,8	41	1,2	29	0,7	31	0,8
LDL	43	1,3	48	1,6	53	1,9	44	1,3	48	1,6	48	1,6
HDL ₁	65	3,1	63	2,9	77	5,5	62	2,8	56	2,2	63	2,9
HDL ₂	78	6,1	77	5,7	78	5,9	78	6,0	79	6,3	78	6,0
UZR	84	9,1	88	11,8	82	7,5	86	10,2	89	10,8	86	10,2

4. ZUSAMMENSETZUNG DER PHOSPHOLIPIDE

In den Tabellen 13-17 sind die Phospholipidmuster der verschiedenen Lipoproteine aufgeführt. Generell ist festzustellen, daß in allen Lipoproteinen Phosphatidylcholin (Lecithin) das dominierende Phospholipid ist. Sein Anteil an den Phospholipiden variiert zwischen 70% beim Ultrazentrifugationsrückstand und 91% bei den HDL₂. Abgesehen vom Ultrazentrifugationsrückstand ist das Sphingomyelin mengenmäßig das zweitwichtigste Phospholipid. Die Phospholipide der HDL₂ enthalten 6%, die der LDL und HDL₁ 17% Sphingomyelin. In den Phospholipiden des Ultrazentrifugationsrückstandes steht aus quantitativer Sicht Lysophosphatidylcholin mit 22% an zweiter Stelle, gefolgt von 7% Sphingomyelin.

Vergleicht man die Werte der Tabelle 14 und 15, so stellt man fest, daß die Phospholipid-Muster der LDL und der HDL₁ praktisch identisch sind. Diese Aussage wird natürlich dadurch eingeschränkt, daß nur 5 Hunde untersucht worden sind.

TABELLE 13

PHOSPHOLIPID-ZUSAMMENSETZUNG DER VLDL

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Phosphatidylcholin	82,0	79,3	84,9	83,8	84,3	83,8
Sphingomyelin	12,3	9,4	5,9	8,6	6,4	8,6
Lysophosphatidylcholin	2,1	2,8	2,5	2,7	2,5	2,5
Phosphatidylinositol	-	1,9	2,0	1,0	1,9	1,9
Phosphatidylethanolamin	3,6	6,6	4,7	3,9	5,0	4,7

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 14

PHOSPHOLIPID-ZUSAMMENSETZUNG DER LDL

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Phosphatidylcholin	76,8	76,2	79,5	73,5	76,7	76,7
Sphingomyelin	16,8	17,4	14,4	13,7	17,7	16,8
Lysophosphatidylcholin	4,1	4,1	3,4	3,4	4,0	4,0
Phosphatidylinositol	1,1	0,8	1,2	1,1	1,0	1,1
Phosphatidylethanolamin	1,2	1,5	1,5	8,3	0,6	1,5

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 15

PHOSPHOLIPID-ZUSAMMENSETZUNG DER HDL₁

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Phosphatidylcholin	78,4	77,0	77,9	81,2	76,6	77,9
Sphingomyelin	17,3	17,0	14,8	14,5	18,8	17,0
Lysophosphatidylcholin	2,1	3,8	2,8	2,0	2,2	2,3
Phosphatidylinositol	1,0	0,8	1,5	1,4	1,1	1,1
Phosphatidylethanolamin	1,1	1,3	3,0	0,9	1,3	1,3

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 16

PHOSPHOLIPID-ZUSAMMENSETZUNG DER HDL₂

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Phosphatidylcholin	89,8	89,2	90,8	92,0	90,8	90,8
Sphingomyelin	6,0	6,0	5,9	3,4	5,5	5,9
Lysophosphatidylcholin	2,0	1,9	1,7	0,9	1,5	1,7
Phosphatidylinositol	1,4	1,4	1,2	1,8	1,2	1,4
Phosphatidylethanolamin	0,8	1,5	0,4	1,9	1,1	1,1

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 17

PHOSPHOLIPID-ZUSAMMENSETZUNG DES ULTRAZENTRIFUGATIONSRÜCKSTANDES

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
Phosphatidylcholin	71,2	55,5	79,8	63,7	70,3	70,3
Sphingomyelin	13,5	6,8	7,0	9,3	5,3	7,0
Lysophosphatidylcholin	13,6	36,0	12,1	21,7	22,7	21,7
Phosphatidylinositol	1,0	1,1	0,9	2,9	1,1	1,1
Phosphatidylethanolamin	0,7	0,7	0,3	2,4	0,5	0,7

Angaben in Gewichtsprozent

5. GASCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE

Abbildung 5 zeigt beispielhaft das Gaschromatogramm eines Phosphatidylcholins.

In den folgenden Tabellen sind die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren aufgeführt (Medianwerte). Die Einzelwerte sind im Anhang enthalten. In die Tabellen wurden nur die Fettsäuren aufgenommen, deren Anteil an den Gesamtfettsäuren mindestens 1% betrug.

Die Cholesterinester der VLDL (Tabelle 18) enthalten jeweils 23% Palmitin- und Ölsäure, gefolgt von der Linolsäure mit 18%. Arachidonsäure wurde nicht gefunden. Der Anteil der gesättigten Fettsäuren beträgt 38%.

In den Triacylglycerinen dominieren Linolsäure mit 32% und Ölsäure mit 25%. Bei einigen Hunden wurden langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Eicosapentaen- und Docosapentaensäure) gefunden. Linolen- und Gadoleinsäure, deren Retentionszeiten auf der EGSS-X-Säule identisch sind und die in den Tabellen gemeinsam aufgeführt werden, wurden bei 3 Hunden auf der Silar-10-C-Säule getrennt. Die Linolensäure überwiegt in allen 3 Fällen (Ergebnis nicht dokumentiert).

Die Fettsäurenmuster der gleichen Phospholipide in den VLDL und LDL sind sich ähnlich und können daher zusammen beschrieben werden (Tabelle 18 und 19). In den Phosphatidylcholinen dominiert die Stearinsäure mit 41% in den VLDL und 39% in den LDL, gefolgt von der Palmitinsäure (19 und 22%). Lediglich die Arachidonsäure weist mit 17% in den VLDL einen deutlich höheren Anteil als in den LDL (9%) auf. In beiden Lipoproteinfraktionen liegen ca. 61% gesättigte Fettsäuren vor.

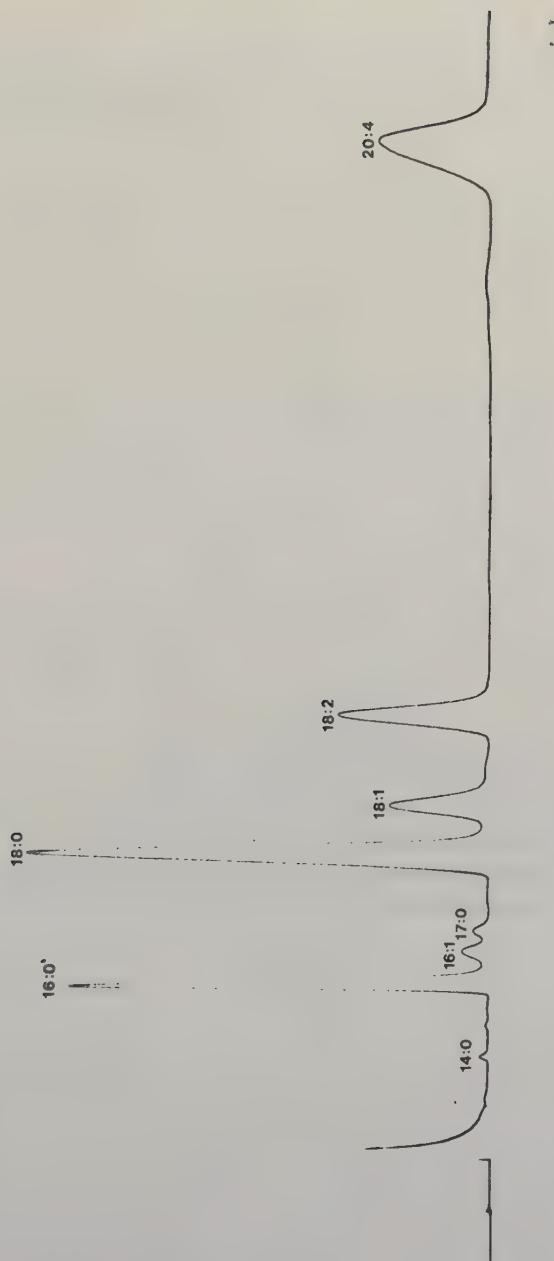


Abbildung 5: Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäurenmethylester eines Phosphatidylcholins (Bedingungen s. Text).

Das Fettsäurenmuster des Lysophosphatidylcholins in den VLDL konnte nur bei 2 Hunden ermittelt werden, da die Probenmengen, die von den anderen Versuchstieren gewonnen werden konnten, für eine gaschromatographische Analyse nicht ausreichten. In den VLDL und LDL überwiegt in den Lysophosphatidylcholin die Stearinsäure mit 56%. Der Palmitinsäureanteil beträgt 32% in den VLDL und 35% in den LDL. Dementsprechend hoch ist der Anteil der gesättigten Fettsäuren (86 und 91%).

Die Fettsäurenmuster der Sphingomyeline in den VLDL und LDL konnten ebenfalls nur bei 2 Hunden ermittelt werden. Die gesättigten Fettsäuren, Palmitin- und Stearinsäure, überwiegen. Im Sphingomyelin der LDL wurden langkettige, gesättigte Fettsäuren (Arachidinsäure, Behensäure und Tricosansäure) gefunden.

Die Cholesterinester der LDL (Tabelle 19) enthalten 47% Linolsäure, 18% Ölsäure und 13% Arachidonsäure. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren beträgt 16%.

Linolsäure (25%), Ölsäure (23%) und Arachidonsäure (22%) machen den Hauptanteil der Fettsäuren in den Triacylglycerinen der LDL aus (Tabelle 19). Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Eicosapentaen-, Docosapentaen- und Docosahexaensäure konnten bei einigen Hunden nachgewiesen werden (Anhang, Tabelle 29).

TABELLE 18

VERY-LOW-DENSITY-LIPOPROTEINE

Fettsäurezusammensetzung

Fettsäure	CE	TG	PC ^x	LPC ^{xx}	Sph ^{xx}
14:0	--	--	--	3,6	5,5
16:0	23,1	19,8	18,8	31,6	42,9
16:1	3,9	4,4	--	4,5	--
18:0	14,6	3,8	41,3	55,5	37,6
18:1	23,3	25,1	7,1	4,9	6,2
18:2	18,0	31,7	12,5	--	4,2
18:3/20:1	--	2,9	--	--	--
20:4	--	9,0	16,9	--	--
20:5	--	2,7	--	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

Medianwerte n=5

^xMedianwerte n=4

^{xx}Mittelwerte n=2

CE: Cholesterinester

TG: Triacylglycerin

PC: Phosphatidylcholin

LPC: Lysophosphatidylcholin

Sph: Sphingomyelin

PI: Phosphatidylinositol

PE: Phosphatidylethanolamin

TABELLE 19

LOW-DENSITY-LIPOPROTEINE

Fettsäurezusammensetzung

Fettsäure	CE	TG	PC	LPC ^x	Sph ^{xx}
14:0	--	--	--	--	1,0
16:0	10,3	13,2	22,4	34,6	55,6
16:1	5,9	4,0	--	2,4	--
18:0	6,0	3,3	39,4	55,9	26,2
18:1	18,1	23,3	9,5	3,4	1,4
18:2	46,9	25,0	15,9	--	--
20:0	--	1,5	--	--	4,1
18:3/20:1	2,8	1,6	--	--	--
22:0	--	--	--	--	4,9
20:4	12,8	21,9	9,4	--	--
20:5	--	7,1	--	--	--
23:0	--	--	--	--	6,0

Angaben in Gewichtsprozent

Medianwerte n=5

^xMedianwerte n=4

^{xx}Mittelwerte n=2

Die Fettsäurenmuster der Lipide der HDL₁, der HDL₂ und des UZR werden gemeinsam beschrieben (Tabellen 20-22).

Die dominierende Fettsäure in den Cholesterinestern ist die Linolsäure mit 49-52%. Der Anteil der Arachidonsäure beträgt in den HDL₁ 14%, in den HDL₂ 24% und im UZR 26%.

In den Triacylglycerinen der HDL₁, der HDL₂ und des UZR überwiegt die Palmitinsäure mit 35, 24 und 26%. Die Ölsäure ist in den Triacylglycerinen der drei Fraktionen zu etwa gleichen Anteilen (23-25%) vorhanden. Der Linolsäureanteil variiert stark. Er beträgt 2% in den Triacylglycerinen der HDL₁, 11% in den Triacylglycerinen der HDL₂ und 17% in den Triacylglycerinen des UZR. Erwähnenswert ist, daß in den Triacylglycerinen aller drei Fraktionen auch eine ungeradzahlige Fettsäure, die Pentadecansäure, mit 2-6% vertreten ist. Bei 4 Hunden konnten in den Triacylglycerinen der HDL₂ und bei einem Hund in den Triacylglycerinen des UZR Fettsäuren nachgewiesen werden, die keiner der bekannten Fettsäuren zuzuordnen waren. In einem orientierenden Versuch, dessen Ergebnis nicht dokumentiert ist, wurde nachgewiesen, daß es sich bei diesen nicht identifizierten Fettsäuren um ungesättigte Fettsäuren handelt. In diesem Versuch wurden die ungesättigten Fettsäuren der Permanganatoxidation unterzogen (PIKAAR und NIJHOF, 1958) und auf diese Weise aus der Fettsäurenmischung entfernt.

Im Phosphatidylcholin der HDL₁, der HDL₂ und des UZR bildet Stearinsäure mit 36-38% den Hauptanteil. Die HDL₁ enthalten 14%, die HDL₂ und der UZR jeweils 22% Arachidonsäure. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren beträgt 54-55%.

Das Lysophosphatidylcholin der HDL₁ enthält 58%, das der HDL₂ 60% und das des UZR 45% Stearinsäure. Der Palmitinsäureanteil beträgt 29-34%. Der Anteil an gesättigten Fettsäuren ist dementsprechend in allen Fraktionen hoch (79-90%).

In den Sphingomyelinen ist die Palmitinsäure die dominierende Fettsäure (50% in den HDL₁, 34% in den HDL₂ und 37% im UZR), gefolgt von der Stearinsäure mit 23-26%. Typisch für das Sphingomyelin ist das Vorkommen von langkettigen Fettsäuren wie Arachidin-, Behen-, Tricosan- und Nervonsäure.

Der Anteil an Phosphatidylinositol und Phosphatidylethanolamin an den Gesamthospholipiden beträgt in den verschiedenen Lipoproteinen in der Regel nur 1-2%. Daher erhält man nur von den HDL₂ und vom UZR Substanzmengen, die für eine gaschromatographische Untersuchung der genannten Lipide ausreichen. Die Fettsäuremuster der Phosphatidylinositole der HDL₂ und des UZR sind in den Tabellen 21 und 22 wiedergegeben. Den Hauptanteil bildet die Stearinsäure mit 59% in den HDL₂ und 63% im UZR. Bemerkenswert ist ein hoher Anteil an Arachidonsäure (20% in den HDL₂ und 13% im UZR).

Phosphatidylethanolamine enthalten ebenfalls Stearinsäure (34 und 39%) als Hauptbestandteil. In den HDL₂ ist ein hoher Anteil an Arachidonsäure zu verzeichnen (24%), im Gegensatz zum UZR (9%). Das Phosphatidylethanolamin der HDL₂ zeichnet sich durch langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren aus. Bei einigen Tieren wurde Eicosapentaen-, Docosatetraen-, Docosapentaen- und Docosahexaensäure gefunden (Anlage, Tabelle 51).

TABELLE 20
HIGH-DENSITY-LIPOPROTEINE-1
Fettsäurezusammensetzung

Fettsäure	CE	TG	PC	LPC ^x	Sph ^x
14:0	--	6,9	--	--	--
15:0	--	5,6	--	--	--
16:0	8,6	34,7	18,1	31,4	49,5
16:1	3,0	11,0	--	3,5	--
17:1	--	2,7	--	--	--
18:0	--	7,1	37,1	58,2	25,7
18:1	14,0	25,0	8,8	3,4	--
18:2	51,5	2,0	15,7	--	--
20:0	--	--	--	--	3,9
22:0	--	--	--	--	4,8
20:4	14,4	--	14,2	--	--
23:0	--	--	--	--	4,8
24:0	--	--	--	--	3,0
24:1	--	--	--	--	2,8

Medianwerte n=5

^xMedianwerte n=4

TABELLE 21

HIGH-DENSITY-LIPOPROTEINE-2

Fettsäurenzusammensetzung

Fettsäure	CE	TG	LC	LPC	Sph	PI	PE
14:0	--	4,5	--	--	--	--	--
15:0	--	2,1	--	--	--	--	--
16:0	7,2	23,5	17,0	28,5	34,0	10,7	16,7
16:1	1,4	6,0	--	--	--	--	--
17:1	--	--	--	--	--	--	2,8
18:0	1,2	5,9	37,9	60,0	22,7	59,0	34,4
18:1	13,7	23,3	8,7	5,3	--	4,1	7,5
18:2	51,9	17,2	16,0	3,3	--	4,3	8,4
20:0	--	--	--	--	4,1	--	--
18:3/20:1	--	2,1	--	--	--	--	--
22:0	--	--	--	--	7,4	--	--
20:4	23,7	6,4	22,1	2,5	--	20,1	23,7
n.i.	--	3,0	--	--	--	--	--
23:0	--	--	--	--	8,7	--	--
24:0	--	--	--	--	7,1	--	--
22:4	--	--	--	--	--	--	2,6
24:1	--	--	--	--	14,7	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

Medianwerte n=5

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 22

ULTRAZENTRIFUGATIONSRÜCKSTAND

Fettsäurezusammensetzung

Fettsäure	CE	TG ^x	LC	LPC	Sph	PI ^x	PE ^x
14:0	--	5,7	--	--	1,3	--	--
15:0	--	4,2	--	--	--	--	--
16:0	6,8	25,6	18,1	34,4	36,9	13,9	29,1
16:1	2,0	9,1	1,0	--	--	--	--
17:1	--	2,0	--	--	--	--	--
18:0	--	5,7	35,5	45,0	24,9	62,8	39,1
18:1	12,5	23,4	8,7	6,8	--	5,3	12,0
18:2	48,8	11,1	15,2	7,9	--	2,9	10,7
20:0	--	--	--	--	4,2	--	--
18:3/20:1	--	2,0	--	--	--	--	--
22:0	--	--	--	--	6,8	--	--
20:4	26,1	6,3	22,0	2,2	--	12,6	9,4
23:0	--	--	--	--	6,9	--	--
24:0	--	--	--	--	6,2	--	--
24:1	--	--	--	--	2,0	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

Medianwerte n=5

^xMedianwerte n=4

IV. DISKUSSION

Die Einteilung der Lipoproteine in Dichteklassen beruht auf den unterschiedlichen Lipid-/Proteinverhältnissen in den verschiedenen Lipoproteinen. Mit zunehmender Dichte, d.h. mit zunehmendem Proteinanteil nimmt die Partikelgröße der Lipoproteine ab. Lipoproteine sind jedoch polydispers. Das bedeutet, daß der Übergang zwischen den Lipoproteinklassen fließend ist. Die Dichtebereiche, die in der vorliegenden Arbeit gewählt wurden, wurden vor allem von DE LALLA und GOFMANN (1954) und HAVEL u.a. (1955) aufgestellt aufgrund der Konzentrationsmaxima, die die verschiedenen Lipoproteine in diesen Bereichen zeigen. Eine Auftrennung in Subklassen ist möglich. Insbesondere die HDL-Subklassen sind von medizinisch-wissenschaftlichem Interesse.

Für einen Vergleich unserer Befunde mit humanen Lipoproteinen wurde im wesentlichen die zusammenfassende Veröffentlichung von SCANU und KRUSKI (1975) herangezogen.

Aus dem Verteilungsmuster der Plasmalipoproteine ist ersichtlich, daß die VLDL bei allen untersuchten Hunden in geringer Menge vorhanden sind. Andere Untersucher fanden in elektrophoretisch getrennten Plasmalipoproteinen einen Anteil von 15% (GROULADE u.a., 1981) und 12% VLDL beziehungsweise Prä- β -Lipoproteinen (ISHIHARA u.a., 1977a). WADA u.a. (1977) fanden keine nennenswerten Konzentrationen und JULIEN u.a. (1981) konnten überhaupt keine VLDL nachweisen. Die von den beiden erstgenannten Autoren beschriebenen Prä- β -Lipoproteine wandern zwischen den LDL und HDL₂, zeigen aber bei den einzelnen Hunden unterschiedliche Mobilitäten. Die HDL₁-Fraktion, die ebenfalls zwischen LDL und HDL₂ wandert, wurde von diesen Autoren nicht beschrieben.

Die unterschiedlichen Befunde könnten zum Teil auf den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden beruhen, die die verschiedenen Autoren angewandt haben. MERTZ und GÖHMANN (1979) fanden, daß die photometrische Auswertung von Lipoproteinen, die mit Lipidfarbstoffen angefärbt worden waren, fehlerhafte Ergebnisse, im Vergleich zur chemischen Analyse, lieferte: In der Mehrzahl der untersuchten Proben waren die für die VLDL ermittelten Werte um das 3-fache erhöht, während die HDL nur zur Hälfte erfaßt wurden.

Obwohl der Anteil der VLDL an den Gesamtlipoproteinen bei den von mir untersuchten Hunden nur ca. 1,5% ausmacht, transportieren die VLDL 38% der Triacylglycerine, da die Triacylglycerine mit 69% der dominierende chemische Bestandteil sind.

Der Gehalt der VLDL an freiem Cholesterin, der von mir ermittelt wurde, stimmt größenordnungsmäßig mit den von MAHLEY und WEISGRABER (1974) und BLOMHOFF u.a. (1978) gefundenen Werten überein. Dagegen fanden MAHLEY und WEISGRABER (1974) in den VLDL einen Cholesterinester-Anteil von 18% gegenüber 2% (BLOMHOFF u.a., 1978) und 3,6% (eigene Untersuchungen). Dementsprechend fanden MAHLEY und WEISGRABER (1974) ein Verhältnis Cholesterinester zu freiem Cholesterin von 6. Der von BLOMHOFF u.a. (1978) ermittelte Wert liegt wie die eigenen Werte unter 1.

Über die Zusammensetzung der Phospholipide der VLDL liegen keine Literaturangaben vor, so daß eine vergleichende Betrachtung nicht möglich ist.

Das Fettsäurenmuster der Cholesterinester der VLDL unterscheidet sich grundlegend von dem Fettsäurenmuster der Cholesterinester aller übrigen Lipoproteinfraktionen. Die Cholesterinester der VLDL haben den höchsten Anteil an gesättigten Fettsäuren (Palmitinsäure 23% und Stearinsäure 15%). Unter den ungesättigten Fettsäu-

ren dominiert die Ölsäure (23%). Der Linolsäureanteil beträgt 18% und Arachidonsäure fehlt völlig. In den Cholesterinestern der LDL, HDL₁, HDL₂ und des UZR dominiert dagegen die Linolsäure mit annähernd 50%. Der Arachidonsäureanteil steigt in den genannten Fraktionen von 13% in den LDL bis auf 26% im UZR an.

Beim Menschen wurden in den Cholesterinestern der VLDL 6% Stearinsäure, 35% Ölsäure und 26% Linolsäure gefunden, während die Werte für die übrigen Fettsäuren annähernd gleich sind wie beim Hund.

Die LDL (1,2%) sind wie die VLDL nur in geringer Konzentration im Plasma des Hundes vorhanden. Humane Plasmalipoproteine enthalten dagegen ca. 50% LDL.

MAHLEY und WEISGRABER (1974) haben die LDL des Hundes durch Pevikon-Block-Elektrophorese von den HDL₁ getrennt und ihre chemische Zusammensetzung untersucht. Sie fanden in den LDL 24% Cholesterinester und 26% Triacylglycerine gegenüber 13% Cholesterinestern und 37% Triacylglycerinen in den von uns untersuchten LDL. Die übrigen Werte stimmen gut überein.

Mit anderen Literaturwerten sind unsere Werte nur eingeschränkt vergleichbar, da andere Autoren sich ausschließlich der Ultrazentrifugation als Trennmethode bedient haben. Mit dieser Methode sind aber LDL und HDL₁ wegen ihres sehr ähnlichen Flotationsverhaltens nicht voneinander zu trennen. Die LDL₁ (1,006-1,019 g/ml) der von BLOMHOFF u.a. (1978) untersuchten 3 Hunde entsprechen mit 12% Protein und 77% Triacylglycerinen eher den VLDL. Die LDL₂ (1,019-1,063 g/ml) haben große Ähnlichkeit mit unseren LDL, unterscheiden sich jedoch durch einen um 40% höheren Proteinanteil. Das kann sicher dadurch erklärt werden, daß in der von BLOMHOFF u.a. (1978) gewonnenen LDL₂-Fraktion Lipoproteine mit einer Dichte $< 1,019$ g/ml nicht enthalten sind.

Die Zusammensetzung der von DANIELSON u.a. (1976) durch Zonalzentrifugation gewonnenen LDL₁ weist große Ähnlichkeit mit der nicht getrennten LDL/HDL₁-Fraktion auf.

Auch Untersuchungen jüngerer Datums gehen nicht auf die Trennung der LDL von der HDL₁-Fraktion ein (CHOPRA und BOWNESS, 1980).

Die LDL des Menschen enthalten 37% Cholesterinester und 11% Triacylglycerine, d.h. die Relation Cholesterinester zu Triacylglycerinen ist beim Menschen umgekehrt wie beim Hund.

Das Verhältnis Cholesterinester zu freiem Cholesterin ist in den LDL größer als in den VLDL und beträgt 1,6. Legt man zugrunde, daß die LDL aus den VLDL dadurch hervorgehen, daß außer einer Spaltung der Triacylglycerine freies Cholesterin, Phospholipide und Apolipoprotein C auf naszierende HDL übertragen werden, so wird die Zunahme des oben genannten Verhältnisses verständlich. Humane LDL-Subfraktionen zeigen mit zunehmender Dichte eine Zunahme des Verhältnisses Cholesterinester zu freiem Cholesterin von 2,8 auf 6,2 (LEE, 1976).

Der Lecithin- und Sphingomyelingehalt der LDL des Hundes wurde von INNERARITY und MAHLEY (1978) bestimmt. Er entspricht den eigenen Befunden. Die anderen, in geringen Konzentrationen vorkommenden Phospholipide, wurden von den genannten Autoren nicht getrennt bestimmt.

Das Fettsäurenmuster der Cholesterinester in den LDL zeigt, daß die gesättigten Fettsäuren nur mit 16% vertreten sind. Dominierende Fettsäure ist die Linolsäure (47%). INNERARITY und MAHLEY (1978) fanden in den Cholesterinestern der LDL des Hundes einen Anteil von ca. 9% Linolsäure und ca. 50% Ölsäure.

Die Cholesterinester der LDL gelten als wichtiges Vehikel für den Transport der Linolsäure in die Zellen. Da die Cholesterinester der LDL nach deren Aufnahme in die Zellen hydrolytisch gespalten werden, steht der Zelle die essentielle Linolsäure für die Synthese von Phospholipiden und Prostaglandinen zur Verfügung.

Analoges gilt auch für die Triacylglycerine der LDL. Die Triacylglycerine der LDL enthalten mehr ungesättigte Fettsäuren (84%) als die Triacylglycerine aller übrigen Lipoproteinfractionen. Die ungesättigten Fettsäuren der Triacylglycerine tragen, nachdem die LDL ins Zellinnere aufgenommen worden sind, ebenfalls zur Versorgung der Zelle mit ungesättigten Fettsäuren bei.

Der Anteil der HDL₁ an den Lipoproteinen beträgt ca. 3%. In ihrer chemischen Zusammensetzung sind sie den von MAHLEY und WEISGRABER (1974) beschriebenen HDL₁ ähnlich. Andere Autoren haben, wie bereits erwähnt, eine elektrophoretische Abtrennung der HDL₁ von der LDL nicht vorgenommen. Die HDL₁ sind von den exakt definierten Lipoproteinen zwar die cholesterinesterreichste Fraktion. Trotzdem werden in den HDL₁ nur ca. 3% der gesamten Cholesterinester transportiert, da der Anteil der HDL₁ an den Gesamtlipoproteinen sehr niedrig ist. Die Zusammensetzung der Phospholipide und die Fettsäurenmuster der verschiedenen Lipide der HDL₁ des Hundes wurden von anderen Autoren nicht untersucht.

Man vermutet, daß die HDL₁ für den Cholesterinstoffwechsel bedeutungsvoll sind, wenn auch die Rolle, die sie spielen, noch nicht geklärt ist. Sicher ist jedoch, daß die HDL₁-Fraktion beim Hund nach cholesterinreicher Fütterung vermehrt auftritt. Sie wird dann von MAHLEY u.a. (1974) als HDL_C bezeichnet.

Der Hund ist ein sogenannter HDL-Typ wegen des hohen Anteils (94%) der HDL₂-Fraktion an den Gesamtlipoproteinen. Ähnliche Verhältnisse findet man auch bei anderen Carnivoren (CHAPMAN, 1980).

Das Ergebnis der chemischen Untersuchung zeigt, daß die HDL₂ vor allem reich an Proteinen sind und daß die nächstwichtigsten Bausteine die Phospholipide und Cholesterinester sind. Der Anteil an freiem Cholesterin beträgt dagegen nur 3%. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen MAHLEY und WEISGRABER (1974), EDELSTEIN u.a. (1976) und BLOMHOFF u.a. (1978).

Aufgrund ihres großen Anteils an den Gesamtlipoproteinen stellen die HDL₂ die wichtigste Transportform dar für Cholesterinester, freies Cholesterin und Phospholipide, von denen sie jeweils annähernd 80% transportieren. Im Gegensatz dazu sind in der menschlichen HDL-Fraktion nur ca. 25% des Gesamtcholesterins enthalten. Diesem Spezies-Unterschied mißt man Bedeutung bei, da zwischen niedrigem HDL-Cholesterin und Häufigkeit von koronaren Herzerkrankungen eine enge positive Korrelation existiert (ASSMANN, 1982).

78% des Cholesterins liegen in den HDL₂ als Estercholesterin vor. Verantwortlich dafür ist das im Plasma vorkommende Enzym LCAT, das von Phosphatidylcholin (Lecithin) Fettsäuren auf das freie Cholesterin der naszierenden HDL überträgt, wobei die Cholesterinester entstehen. Bei Hunden mit Hepatopathien, die sich unter anderem in einem LCAT-Mangel äußern, kann das Estercholesterin auf Werte unter 64% des Gesamtcholesterins im Plasma abfallen (OPITZ und LETTOW, 1976). Filariasis, die zu Lebererkrankungen führt, äußert sich ebenfalls in einem erniedrigten Verhältnis von Estercholesterin zu Gesamtcholesterin, verbunden mit erhöhten Prä- β -, β - und erniedrigen α - Lipoproteinkonzentrationen im

Plasma (ISHIHARA u.a., 1977b; ISHIHARA u.a., 1978). Phosphatidylcholin hat mit 91% den höchsten Anteil an den Phospholipiden der HDL₂. EDELSTEIN u.a. (1976) fanden in der gleichen Fraktion 84%. SKIPSKI u.a. (1967) fanden beim Menschen in allen Lipoproteinfraktionen Spuren von Phosphatidylserin und Polyglycerophosphatiden, die beim Hund nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Fettsäurenmuster der Cholesterinester in den HDL₁ und HDL₂ sind sich ähnlich. Lediglich der Arachidonsäuregehalt ist in den HDL₂ (24%) deutlich höher als in den HDL₁ (14%). EDELSTEIN u.a. (1976) fanden in den Cholesterinestern der HDL₂ des Hundes einen Arachidonsäureanteil von 8%. Die Fettsäurenmuster der Cholesterinester und des Phosphatidylcholins der HDL₁- und der HDL₂-Fraktionen und des Lysophosphatidylcholins des UZR müssen im Zusammenhang mit der LCAT-Reaktion gesehen werden. Im Phosphatidylcholin sind die Fettsäuren nicht statistisch verteilt: Vielmehr überwiegen in der Position 1 die gesättigten, in der Position 2 die ungesättigten Fettsäuren. Das Enzym LCAT verestert in erster Linie die mittelständigen Fettsäuren des Phosphatidylcholins (Position 2) mit Cholesterin (MARCEL, 1982). Deshalb zeichnen sich die Cholesterinester der oben genannten Fraktionen durch einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aus, während im Lysophosphatidylcholin, das in der Transferase-Reaktion entsteht und das im UZR enthalten ist, die gesättigten Fettsäuren überwiegen (79-90%).

Ähnliche Ergebnisse liegen für den Menschen vor. Annähernd 90% der Fettsäuren in den Cholesterinestern der HDL sind ungesättigt. Linolsäure hat einen Anteil an den Gesamtfettsäuren von über 50%. Das Lysophosphatidylcholin, das allerdings von NELSON (1962) nur in

den Gesamtlipoproteinen bestimmt worden ist, enthält, wie beim Hund, überwiegend gesättigte Fettsäuren. Die Fettsäurenmuster der Sphingomyeline der HDL₁, der HDL₂ und des UZR sind dadurch gekennzeichnet, daß fast ausschließlich gesättigte Fettsäuren vorkommen. Lediglich im Sphingomyelin der HDL₁ ist die einfach ungesättigte Nervonsäure in größerer Menge (15%) vorhanden. Typisch für die Sphingomyeline ist ferner das Vorkommen von Arachidin-, Behen-, Tricosan- und Lignocerin-säure. Tricosansäure konnte ausschließlich in den Sphingomyelinen nachgewiesen werden. NELSON (1962) hat in den Sphingomyelinen der Gesamt-Plasmaproteine des Menschen ebenfalls Tricosansäure nachgewiesen. Hinweis auf Stoffwechselprozesse, die die Existenz dieser ungeradzahligten Fettsäure in relativ hoher Konzentration erklären würden, gibt es nicht.

In den Phosphatidylinositolen der HDL₂ und des UZR überwiegt die Stearinsäure (59 und 63%). Hoch ist auch der Anteil der Arachidonsäure (20%) im Phosphatidylinositol der HDL₂. Beim Menschen dominiert ebenfalls die Stearinsäure im Phosphatidylinositol der HDL. Für die Arachidonsäure wurde ein Anteil von 27% ermittelt (BRECKENRIDGE und PALMER, 1982).

In den Phosphatidylethanolaminen der HDL₂ und des UZR ist ebenfalls die Stearinsäure die am stärksten vertretene Fettsäure. Das Phosphatidylethanolamin der HDL₂ ist außerdem die arachidonsäurereichste (24%) Phospholipid-Fraktion. Bei einigen Hunden zeichnet sich das Phosphatidylethanolamin der HDL₂ durch langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren aus. NELSON (1962) fand beim Menschen in den Phosphatidylethanolaminen der Gesamt-Plasmalipoproteine 25% Arachidonsäure und ebenfalls langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

Betrachtet man die Verteilung der Lipide auf die Lipoproteine, so zeigt sich, daß die Lipoproteine, die üblicherweise beschrieben werden und deren Stoffwechsel Ziel umfangreicher Untersuchungen ist, nur ca. 80% der insgesamt im Plasma vorhandenen Lipide transportieren. Der Rest von ca. 20% ist bei unserer Untersuchungsmethode im sogenannten Ultrazentrifugationsrückstand enthalten, der von manchen Autoren auch als Very-High-Density-Lipoproteine (VHDL) bezeichnet wird. Die Vermutung, daß der Ultrazentrifugationsrückstand des Hundes einen hohen Lipidanteil enthält, wurde bereits von CHAPMAN (1980) aufgrund der Untersuchungen von MAHLEY und WEISGRABER (1974) geäußert. MAHLEY und WEISGRABER (1974) hatten in den von ihnen untersuchten Lipoproteinen zusammengekommen weniger Lipide gefunden als im Gesamtplasma. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von JULIEN u.a. (1981) und GROULADE u.a. (1981), die bei der Lipoproteinelektrophorese des Hundeserums eine "Fast- α "- bzw. "Prä- α "-Lipoproteinfraktion fanden. Beim Menschen wurde diese Fraktion ebenfalls gefunden und durch Ultrazentrifugation in zwei Subfraktionen VHDL₁ (1,21-1,25 g/ml) und VHDL₂ (> 1,25 g/ml) getrennt (ALAUPOVIC u.a., 1966). Elektrophoretisch wurde beim Menschen im Ultrazentrifugationsrückstand eine "Prä- α "-Lipoproteinfraktion identifiziert (PHILLIPS und WILLE, 1973).

ALAUPOVIC u.a. (1966) fanden in den VHDL₁ ein Verhältnis Cholesterinester zu freiem Cholesterin von ca. 10, ein Ergebnis, das im Ultrazentrifugationsrückstand des Hundes von mir ebenfalls ermittelt wurde.

Beim Menschen ermittelten ALAUPOVIC u.a. (1966) in den Gesamtphospholipiden der VHDL (> 1,21 g/ml) einen Anteil von ca 22% Lysophosphatidylcholin, PHILLIPS

und WILLE (1973) einen von ca 33% in den "Prä- α "-Lipoproteinen. Beim Hund wurden von mir im UZR ca. 22% Lysophosphatidylcholin gefunden. Der Anteil variiert von Tier zu Tier zwischen 13,6% und 36%. Das aus der LCAT-Reaktion stammende Lysophosphatidylcholin wird größtenteils an Albumin gebunden und ist somit im Ultrazentrifugationsrückstand enthalten.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß die verschiedenen Lipoproteine sehr unterschiedlich zusammengesetzt sind. Zieht man mit in Betracht, daß beispielsweise Cholesterin, das Bestandteil der LDL ist, eine völlig andere Funktion erfüllt als Cholesterin, das Bestandteil der HDL ist, so ergibt sich daraus die Notwendigkeit, bei Lipoproteinstoffwechseluntersuchungen die Lipoproteine möglichst weitgehend zu differenzieren. Die Arbeit hat aber auch gezeigt, daß eine sehr weitgehende Differenzierung der Lipoproteine des Hundes methodisch besonders aufwendig und kompliziert ist, einmal weil sich LDL und HDL₁ nicht durch Ultrazentrifugation trennen lassen, zum andern weil der Anteil der HDL₂ an den Gesamtlipoproteinen 95% ausmacht und sich die übrigen 3 Fraktionen auf die restlichen 5% verteilen. Eine routinemäßige Untersuchung der kleinen Fraktionen ist sicher nicht möglich. Andererseits ist zu bedenken, daß sich im Krankheitsfalle das Lipidmuster stark verändern kann.

Es ist unzulässig die gefundenen Werte zu verallgemeinern, da sie nur an 5 Hunden ermittelt worden sind. Manche gaschromatographischen Untersuchungen konnten nicht an allen 5 Hunden durchgeführt werden, weil der Anteil des Lipoproteins an den Gesamtlipoproteinen nur 1-2% betrug und Lipide wie beispielsweise Phosphatidylethanolamin oder Sphingomyelin in diesen Lipoproteinen wiederum nur zu einem sehr geringen Prozentsatz vertreten waren. Trotz dieser Einschränkungen, die zweifellos gemacht werden müssen, ist es möglich und auch von Interesse, die verschiedenen Lipoproteine eines Tieres miteinander zu vergleichen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Plasmalipoproteine des Hundes wurden durch Ultrazentrifugation und Agarose-Gel-Elektrophorese isoliert, und die chemische Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde untersucht. Die Lipide der Lipoprotein-Frak-tionen wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und die Fettsäurenmuster mit Hilfe der Gaschromatographie ermittelt.

Die Lipoproteine weisen die folgende Verteilung auf:

1,5% VLDL, 1,2% LDL, 3,2% HDL₁ und 94% HDL₂.

VLDL, LDL, HDL₁ und HDL₂ transportieren ca. 80% der im Plasma vorhandenen Lipide. Der Rest von ca. 20% ist im Ultrazentrifugationsrückstand enthalten. Die Dichte der einzelnen Lipoprotein-Frak-tionen erhöht sich mit zunehmendem Proteingehalt.

Die VLDL und die LDL sind triacylglycerinreich. In den HDL₁ dominieren die Cholesterinester und die Phospholipide, und in den HDL₂ sind die Phospholipide die quantitativ wichtigsten Lipide.

Mit zunehmender Dichte steigt der Anteil des Estercholesterins am Gesamtcholesterin an.

In allen Lipoprotein-Frak-tionen ist Phosphatidylcholin (Lecithin) das dominierende Phospholipid. Abgesehen vom Ultrazentrifugationsrückstand ist das Sphingomyelin mengenmäßig das zweitwichtigste Phospholipid. In den Phospholipiden des Ultrazentrifugationsrückstandes steht aus quantitativer Sicht Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin) an zweiter Stelle.

Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Öl-, Linol-, Arachidon- und Nervonsäure sind die hauptsächlich am Aufbau der Lipide beteiligten Fettsäuren.

In den Cholesterinestern der Lipoproteinfraktionen dominieren die ungesättigten Fettsäuren. Der Arachidonsäureanteil der Cholesterinester nimmt mit steigender Dichte der Lipoproteine zu.

In den Triacylglycerinen sind die Öl- und die Linol-säure die wichtigsten ungesättigten Fettsäuren. Die Triacylglycerine der LDL enthalten den höchsten Anteil an ungesättigten Fettsäuren, die der HDL₁ den geringsten.

In den Phospholipiden der Lipoproteinfraktionen überwiegen die gesättigten Fettsäuren. Der höchste Anteil ist in den Lysophosphatidylcholinen und in den Sphingomyelinen zu verzeichnen. In den Sphingomyelinen dominiert die Palmitinsäure, in den übrigen Phospholipiden die Stearinsäure. Typisch für die Sphingomyeline sind außerdem langkettige Fettsäuren wie Arachidin-, Behen-, Tricosan- und Nervonsäure. Das Phosphatidyl-inositol und das Phosphatidylethanolamin der HDL₂-Fraktion zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Arachidonsäure aus.

SUMMARY

After isolating the plasma lipoproteins of the dog by ultracentrifugation and by agarose gel electrophoresis, the chemical composition was examined. The lipids of the isolated lipoprotein fractions were separated by thin layer chromatography and the fatty acid patterns were determined by gas liquid chromatography.

The lipoproteins show the following composition: 1,5% VLDL, 1,2% LDL, 3,2% HDL₁, and 94% HDL₂. 80% of the lipids present in plasma are transported by VLDL, LDL, HDL₁, and HDL₂. The remaining 20% are found in the residue following ultracentrifugation. The density of the individual lipoprotein fractions increases with increasing protein content.

VLDL and LDL are triacylglycerol-rich lipoproteins. In HDL₁ cholesterol esters and phospholipids are predominating. In HDL₂ phospholipids are the most abundant lipids.

The cholesterol ester/total cholesterol ratio increases with increasing density.

Phosphatidylcholine (lecithin) is the predominating phospholipid in all lipoprotein fractions. With the exception of the ultracentrifugation residue, sphingomyelin is the second most abundant phospholipid. In the ultracentrifugation residue lysophosphatidylcholine (lysolecithin) is the second most abundant phospholipid.

The most abundant fatty acids are palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, arachidonic, and nervonic.

In the cholesterol esters of the lipoproteins unsaturated fatty acids are predominating. The arachidonic acid content of the cholesterol esters increases with increasing density of the lipoproteins.

Oleic and linoleic are the most important unsaturated fatty acids in triacylglycerols. Triacylglycerols of LDL are highest and those of HDL₁ are lowest in concentration of unsaturated fatty acids.

In phospholipids, saturated fatty acids are predominating of which by far the greatest portion is present in lysophosphatidylcholine and in sphingomyelin. Palmitic is the chief fatty acid in sphingomyelins, whereas stearic is the predominating fatty acid of all other phospholipids. Characteristically, sphingomyelins contain the following fatty acids: arachidonic, behenic, tricosanic, and nervonic. The phosphatidylinositols and phosphatidylethanolamines of the HDL₂-fraction contain large amounts of arachidonic acid.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ALAUPOVIC,P.,SANBAR,S.S.,FURMAN,R.H., SULLIVAN,M.L. und WALRAVEN,S.L., 1966:Studies of the composition and structure of serum lipoproteins.Isolation and characterization of very high density lipoproteins of human serum.
Biochemistry 5,4044-4053
- ANGELIN,B., CAROL,A., INNERARITY,T.L. und MAHLEY,R.W., 1983: Regulation of hepatic lipoprotein receptors in the dog.
J.Clin.Invest. 71, 816-831
- ASSMANN,G., und SCHMITZ,G., 1979: The metabolism of plasma-lipoproteins.Aus: Lipoprotein Metabolism and Endocrine Regulation.Herausgeber:Hessel,L.W. und Kraus,H.M.I. ,Elsevier/North-Holland,Biomedical Press 3-12
- ASSMANN,G., 1982: Lipidstoffwechsel und Atherosklerose.Herausgeber: Assmann,G., F.K.Schattauer Verlag GmbH,Stuttgart
- AUGUSTIN,J., MIDDELHOFF,G. und VIRGILBROWN,W., 1976:Metabolismus der Lipoproteine. Aus: Handbuch der inneren Medizin, Band 7 Fettstoffwechsel. Herausgeber: Schettler,G., Greten,H., Schlierf,G .und Seidel,D.,Springer Verlag,Berlin Heidelberg New York, 219-264
- BACHORIK,P.S., 1979: Factors that affect HDL-cholesterol measurements:Sample preparations and storage at refrigerator and freezer temperatures. Aus: Report of the high density lipoprotein methodology workshop. Herausgeber: Lippel,K., Departement of Health, Education and Welfare, National Institutes of Health, 164-170

BALL, D.L. und HARRIS, W.E., 1968: Selection of optimum position für measuring widths of chromatographic peaks with minimum error in area. Anal.Chem. 40, 1113-1116

BLOMHOFF, J.P., HOLME, R. und ØSTREM, J., 1978: Plasma cholesterol esterification and plasma lipoproteins in bile-duct-ligated dogs. Scand.J.Gastroent. 13, 693-702

BLUM, C.B., 1982: Dynamics of apolipoprotein E metabolism in humans. J.Lipid Res. 23, 1308-1316

BRECKENRIDGE, W.C., und PALMER, F.B.St.C., 1982: Fatty acid composition of human plasma lipoprotein phosphatidylinositols. Biochim.Bioph.Acta 712, 707-711

BROWN, M.S. und GOLDSTEIN, J.L., 1975: Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. Cell 6, 307-316

BROWN, M.S. und GOLDSTEIN, J.L., 1978: A general scheme of regulation of cholesterol metabolism in mammalian cells. Aus: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Herausgeber: Dietschy, J.M., Gotto, A.M.Jr., Ontko, J. American Physiological Society, Bethesda Md. 173-180

BRUIJNE, J.J., AITSZULER, N., HAMPSHIRE, J., VISSER, T.J. und HACKENG, W.H.L., 1981: Fat mobilization and plasma hormone levels in fasted dogs. Metabolism 30, 190-194

CHAJEK, T. und EISENBERG, S., 1978: Very low density lipoproteins. Metabolism of phospholipids cholesterol and apolipoprotein C in the isolated perfused rat heart. J.Clin.Invest. 61, 1654-1665

CHAPMAN, M.J., 1980: Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative aspects. J.Lipid Res. 21, 789-853

CHOPRA,R.K. und BOWNESS,J.M., 1981: The association of inter-cellular structural glycoproteins with lipids in canine cartilage. *Can.J.Biochem.* 59, 191-201

CHRISTIE,W.W., 1973: The analysis of complex lipids. Aus: *Lipid Analysis*. Herausgeber: Christie,W.W., Pergamon Press, Oxford, New York, 176-227

DANIELSSON,B., EKMAN,R., JOHANSSON,B.G. und PETERSON,B.G., 1976: Abnormal low density plasma lipoproteins occuring in dogs with obstructive jaundice. *FEBS Lett.* 63, 33-36

De LALLA,O.F. und GOFMAN,J.W., 1954:Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. *Meth.biochem.Analysis* 1,459-478

DUCK-CHONG,C.G., 1979: A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrat. *Lipids* 14, 492-497

EDELSTEIN,C., LEWIS,A., SHAINOFF,J.R., NAITO,H. und SCANU,A.M., 1976: Isolation and characterization of a dog serum lipoprotein having apolipoprotein A-I as its predominant protein constituent. *Biochemistry* 15, 1934-1941

EDELSTEIN,C.,HALARI,M. and SCANU,A.M., 1982: On the mechanism of displacement of apolipoprotein A-I by apolipoprotein A-II from the high density lipoprotein surface.
J.Biol.Chem. 7189-7195

EISENBERG,S. und LEVY,R.L., 1975:Lipoprotein Metabolism. *Adv.Lipid Res.* 13, 1-89

FIELDING,C.J., SHORE.V.G. und FIELDING,P.E., 1972: A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46, 1493-1498

FIELDING,C.J. und HAVEL,R.J., 1977: Lipoprotein lipase:properties of the enzym in solution.
Arch.Path.Lab.Med 101, 225-229

FIELDING,C.J.,und FIELDING,P.E., 1980: Characteristics of triacylglycerol and partial acylglycerol hydrolysis by human plasma lipoprotein lipase. Biochim.Biophys.Acta,620, 440-446

FOLCH,J., LEES,M. und SLOANE-STANLEY,G.H., 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J.Biol.Chem. 226, 497-509

FORD,R.B., 1977: Clinical application of serum lipid profiles in the dog. Gaines veterinary Symposium, Texas AM University, College Station Texas, Oct.5., 12-16

GLASS,R.L., 1971: Alcohoysis,saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. Lipids 6, 919-925

GLOMSET,J.A., 1968: The plasma lecithin:cholesterol acyl-transferase reaction, J.Lipid Res. 9, 155-167

GOLDSTEIN,J.L., DANA,S.E., FAUST,J.R., BEAUDET,A.L. und BROWN,M.S., 1975: Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein: Observation in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. J.Biol.Chem. 250, 8487-8495

GOLDSTEIN,J.L. und BROWN,M.S., 1977: Atherosclerosis: The low density lipoprotein receptor hypothesis.
Metabolism 26, 1257-1275

GOLDSTEIN,J.L., ANDERSON,R.G.W. und BROWN,M.S., 1979:Coated pits,coated vesicles and receptor-mediated endocytosis.
Nature 279, 679-685

- GREEN, P.H.R., TALL, A.R. und GLICKMANN, R.M., 1978: Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. J.Clin.Invest. 61, 528-534
- GREEN, P.H.R. und GLICKMAN, R.M., 1981: Intestinal lipoprotein metabolism. J.Lipid Res. 22, 1153-1173
- GROSSER, J., SCHRECKER, O., und GRETEN, H., 1981: Function of hepatic triglyceride lipase in lipoprotein metabolism. J.Lipid Res. 22, 437-451
- GROULADE, P., GROSLAMBERT, P., FOULON, T. und GROULADE, J., 1981: Electrophorèse des lipoprotéines sériques de l'homme et du chien adultes normaux. Remarques sur l'expérimentation. Bull.Acad.Nat.Med. 165, 1243-1250
- HAMILTON, R.L., 1978: Hepatic secretion and metabolism of high density lipoproteins. Aus: Disturbances in Lipid and Lipoprotein Metabolism. Herausgeber: Dietschy, J.M., Gotto, A.Jr. Ontko, J. American Physiolog. Society, Bethesda Md. 155-171
- HARM, K. und BÜTZOW, G.H., 1980: Lipide. Aus: Ernährungslehre und Diätetik Band I: Biochemie und Physiologie der Ernährung Teil 2. Herausgeber: Cremer, H.-D., Hötzel, D. und Kühnau, J., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 310-318
- HATCH, F.T. und LEES, R.S., 1968: Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv.Lipid Res. 6, 1-68
- HAVEL, R.J., EDER, H.A., und BRAGDON, J.H., 1955: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J.Clin.Invest. 1345-1353
- HAVEL, R.J., KANE, J.P. und KASHYAP, M.L., 1973: Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man. J.Clin.Invest. 52, 32-38

HAVEL,R.J., 1978: High density lipoproteins and atherosclerosis. Herausgeber: Gotto,A.M.Jr., Miller,N.E. und Oliver,M.F. Elsevier Amsterdam 21

IMAIZUMI,K., FAINARU,M. und HAVEL,R.J., 1978: Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins. J.Lipid Res. 19, 712-722

INNERARITY,T.L., und Mahley,R.W., 1978: Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. Biochemistry 17, 1440-1447

ISHIHARA,K., SUGANUMA,Y. und WATANABE,Y, 1977a: Electrophoretical studies on serum lipoprotein fractions in normal dogs. Jap.J.vet.Sci. 39, 149-157

ISHIHARA,K., SUGANUMA,Y., WATANABE,Y., OJIMA,M. und KITAGAWA,H., 1977b: Electrophoretical studies on serum lipoprotein fractions in canine dirofilariasis. Jap.J.vet.Sci. 39 , 255-264

ISHIHARA,K., OJIMA,M., KITAGAWA,H.,und SUGANUMA,Y.,1978: Studies on serum free cholesterol concentration and serum lecithin cholesterol acyltransferase activity in canine dirofilariasis. Jap.J.vet.Sci. 40, 171-183

JULIEN,P., DOWARE,E. und ANGEL,A., 1981: Lipoprotein composition and transport in the pig and dog cardiac lymphatic system. Circ.Res. 49, 248-254

KAISER,R., 1964: Chromatographie in der Gasphase. 4.Teil Bibliographisches Institut,Mannheim

KATES,M. 1964: Simplified procedures for hydrolysis or methanolysis of lipids. J.Lipid Res. 5, 132-135

LEE,D.M., 1976: Isolation and characterization of low density lipoproteins. Aus: Low Density Lipoproteins. Herausgeber: Day,C.E. und Levy,R.S., Plenum Press, New York 3-38

LEMIEUX,G. und PLANTE,G.E., 1968: The effect of starvation in the normal dog including the dalmatian coach hound. Metabolism 17, 620-630

LINDGREN,F.T.,NICHOLS,A.V., FREEMAN,N.K., WILLS,R.D., WING,L. und GULLBERG,J.E., 1964: Analysis of low-density lipoproteins by preparative ultracentrifugation und refractometry. J.Lipid Res. 5, 68-74

MAHLEY,R.W.,und WEISGRABER,K.H., 1974: Canine lipoproteins and Atherosclerosis. I.Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs.Circ.Res.35, 713-721

MAHLEY,R.W., WEISGRABER,K.H. und INNERARITY,T., 1974: Canine lipoproteins and atherosclerosis. II.Characterization of the plasma lipoproteins associated with atherogenic and non-atherogenic hyperlipidemia. Circ.Res. 35, 722-733

MAHLEY,R.W., INNERARITY,T., WEISGRABER,K.G. und FRY,D.L., 1977: Canine Hyperlipoproteinemia and atherosclerosis. Am.J.Pathol. 87, 205-226

MANNING,P.J., CORWIN,L.A.Jr. und MIDDLETON,C.C.,:1973: Familial hyperlipoproteinemia and thyroid dysfunction of Beagles. Exp.Mol.Pathol. 19, 378-388

MARCEL,Y.L., 1982: Lecithin:cholesterol acyltransferase and intravascular cholesterol transport. Adv.Lipid Res. 19, 85-136

MASORO,E.J., 1977: Lipids and lipid metabolism.

Ann. Rev. Physiol. 39, 301-321

MELCHIOR,G.W., MAHLEY,R.W. und BUCKHOLD,D.K., 1981: Chylomicron metabolism during dietary-induced hypercholesterolemia in dogs. J. Lipid Res. 22, 598-609

MERTZ,D.P. und GÖHMANN,E., 1979: Lipoproteinanalytik.

Med. Klin. 74, 866-870

MORRISETT,J.D., JACKSON,R.L. und GOTTO,A.M.Jr., 1975:

Lipoproteins: Structure and function.

Ann. Rev. Biochem. 44, 183-207

NAKAI,T. und WHAYNE,T.F., 1976: Catabolism of canine apolipoprotein A-I: Purification, catabolic rate, organs of catabolism and the liver subcellular catabolic site.

J. Lab. Clin. Med. 88, 63-80

NELSON,G.J., 1962: Studies of human serum lipoprotein phospholipids and phospholipid fatty acid compositions by silic acid chromatography. J. Lipid Res. 3, 71-79

NELSON,G.J. 1975: Isolation and purification of lipids from animal tissues. Aus: Analysis of lipids and lipoproteins.

Herausgeber: Perkins,E.G., American Oil Chemists' society 1-22

NICOLL,A., MILLER,N.E. und LEWIS,B., 1980: High-density-lipoprotein metabolism. Adv. Lipid Res. 17, 53-106

OPITZ,M., 1966a: Essentielle Hyperlipidämie bei einem Hund.

Zentralbl. Veterinärmed.(A) 13, 139-148

OPITZ,M., 1966b: Nephrotisches Syndrom beim Hund.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 79, 417-419, 425-429

OPITZ,M., 1972: Serumlipiduntersuchungen bei Hunden mit Diabetes mellitus.Aus: Diabetes mellitus in the dog. Proceedings of the Gaines European Veterinary Symposium held in Amsterdam 22-24

OPITZ,M. und LETTOW,E., 1976: Der Cholesterinesterquotient im Serum leberkranker Hunde. B.M.T.W. 89, 28-32

OPITZ,M. und SIEGERT,M., 1978: Distribution pattern of canine lipoproteins in various spontaneously occurring disease conditions estimated by agarose gel electrophoresis. Aus: Protides of the biological fluids (Proceedings of the 25th Colloquium). Herausgeber: Peeters,H., Pergamon Press, Oxford and New York 515-518

PARKER,F. und PETERSON,N.F., 1965: Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin layer chromatograms. J.Lipid Res. 6, 455-460

PATCH,J.R., GOTTO,A.M.Jr., OLIVECRONA,T. und EISENBERG,S., 1978: Formation of high density lipoprotein 2-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 75, 4519- 4523

PETERSON,G.L., 1977: A simplification of the protein assay method of Lowry et.al. which is more generally applicable. Analyt.Biochem. 83, 346-356

PHILLIPS,G.B. und WILLE,L.E., 1973: The phospholipid composition of human serum lipoprotein fractions separated by electrophoresis on agarose gel. Demonstration of a fraction with high lysolecithin content. Clin.Chim.Acta 49, 153-160

PIKAR,N.A. und NIJHOF,J., 1965: Entfernung der ungesättigten Bestandteile durch Permanganatoxidation. Aus: Untersuchung und Bestimmung der Lipide im Blut. Herausgeber: Zöllner,N. und Eberhagen,D., Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York

REDGRAVE,T.G., 1970: Formation of cholesteryl esters in particulate lipid during metabolism of chylomicrons.

J. Clin. Invest. 49, 465-471

ROBINSON,D.S., 1970: The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport. Comp. Biochem. 18, 51-105

RÖSCHLAU,P., BERNT, E. und GRUBER,W., 1975: 9th Intern. Congress on Clin. Chemistry 1975 Abstr. NO.1

RODRIGUEZ,M. und FERMIN,L., 1981: Le lipodigramme.

Hyperlipidémies chez le chien. L'Anim. de Cie. 16, 25-40

ROGERS,W.A., DONOVAN,E.F. und KOCIBA,G.J., 1975a: Idiopathic hyperlipoproteinemia in dogs. JAVMA 166, 1087-1091

ROGERS,W.A., DONOVAN,E.F. und KOCIBA,G.J., 1975b: Lipids and lipoproteins in normal dogs and dogs with secondary hyperlipoproteinemia. JAVMA 166, 1092-1099

ROGERS,W.A., 1977: Lipemia in the dog.

Vet. Clin. North. Am. 7, 637-647

RYU,E.K. und COSS,M., 1979: Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives on thin-layer chromatograms. J. Lipid Res. 20, 561-563

SCANU, M.A. und KRUSKI, A.W., 1975: The chemistry of serum lipoproteins. Aus: International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics 24, 21-38

SCANU, M.A. und LANDSBERGER, F.R., 1980: Lipoprotein structure. Ann. N.Y. Acad. Sci. 348, 1-436

SCHAEFER, J.E., JENKINS, L.L., BREWER, H.B. Jr., 1978: Human chylomicron apolipoprotein metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 405-412

SEIDEL, G., 1979: Die Lipide des Plasmas. Welche Rolle spielen sie in der Atherogenese? Lebensversicherungsmedizin 31, 147-151

SIEGERT, M. und BIENEK, Patentnummer: 1 773 273 Int.Cl.B01 d Deutsche Kl.: 12 d 13 Auslegungstag: 20. Aug. 1970

SKIPSKI, V.P., BARCLAY, M., BARCLAY, R.K., FETZER, V.A., GOOD, J.J. und ARCHIBALD, F.M., 1967: Lipid composition of human serum lipoproteins. Biochem. J. 104, 340-352

STEINER, G., POAPST, M. und DAVIDSON, J.K., 1975: Production of chylomicron-like lipoproteins from endogenous lipid by the intestine and liver of diabetic dogs. Diabetes 24, 263-271

STEINER, G. und ILSE, W.K., 1980: Heterogeneity of VLDL triglyceride production by the liver and intestine. Can. J. Biochem. 59, 637-641

STRAUSS, E.S., 1966: Electron microscopic study of intestinal fat absorption. J. Lipid Res. 18, 307-323

- TALL,A.R., GREEN,P.H.R., GLICKMANN,R.M. und RILEY,J.W.,
1979: Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apo-
lipoproteins in the rat. J. Clin. Invest. 64, 977-989
- TALL,A.R. und SMALL,D.M., 1980: Body cholesterol removal:
Role of plasma HDL. Adv. Lipid Res. 17, 2-51
- TUCKEY,R.C. und STEVENSON,P.M., 1979: Methanolysis of
cholesteryl esters: Conditions for quantitative preparation
of methyl esters. Analyt. Biochem. 94, 402-408
- WADA,M., MINAMISONO,T.,EHRHART,L.A.,.NAITO,H.K. und
MISE,J., 1977: Familial hyperlipoproteinemia in Beagles.
Life Sci. 20, 999-1008
- WEIK,H. und ALTMANN,H.-J., 1971: Das Verhalten einiger Blut-
lipide während des Hungerns beim Pferd.
Zbl. Vet. Med.(A) 18, 131-138
- ZAHLER,P., 1967: Bestimmung von Kephalin, Lecithin, Lyso-
lecithin und Sphingomyelin im Serum oder in anderen biologi-
schen Flüssigkeiten. Z. klin. Chem. und klin. Biochem.
5, 191-198

VII ANHANG

TABELLE 23

FETTSÄURENMUSTER DER CHOLESTERINESTER DER VLDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
14:0	--	21,0	--	--	--	--
16:0	23,1	31,7	16,4	27,6	14,9	23,1
16:1	3,8	--	9,1	3,9	6,3	3,9
18:0	47,7	14,6	11,2	27,2	8,7	14,6
18:1	16,2	20,4	26,4	23,3	30,1	23,3
18:2	9,2	12,4	39,9	18,0	40,0	18,0

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 24

FETTSÄURENMUSTER DER TRIACYLGLYCERINE DER VLDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
14:0	1,8	--	--	1,3	--	--
16:0	28,0	23,5	19,2	18,7	19,8	19,8
16:1	3,9	4,7	4,7	3,4	4,4	4,4
18:0	4,4	4,9	3,1	3,8	--	3,8
18:1	26,3	26,6	21,1	25,1	24,0	25,1
18:2	31,7	32,2	31,4	31,6	31,9	31,7
18:3/20:1	2,9	4,6	3,3	2,3	2,6	2,9
20:4	1,1	3,6	9,0	11,2	9,5	9,0
20:5	--	--	5,6	2,7	3,4	2,7
22:5	--	--	2,7	--	4,6	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 25

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLCHOLINS DER VLDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	2,1		--	--	--	--
16:0	29,1		16,1	21,4	13,5	18,8
18:0	54,9		37,8	44,7	34,0	41,3
18:1	5,6		7,8	9,5	6,4	7,1
18:2	8,4		15,6	13,3	11,8	12,5
20:4	--		22,7	11,1	34,3	16,9

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 26

FETTSÄURENMUSTER DES LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINS DER VLDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	7,2				--	3,6
16:0	28,6				34,6	31,6
16:1	--				8,9	4,5
18:0	64,2				46,9	55,5
18:1	--				9,7	4,9

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 27

FETTSÄURENMUSTER DES SPHINGOMYELINS DER VLDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	2,1				8,9	5,5
16:0	29,1				56,7	42,9
18:0	54,9				20,2	37,6
18:1	5,6				6,8	6,2
18:2	8,4				--	4,2

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 28

FETTSÄURENMUSTER DER CHOLESTERINESTER DER LDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0	10,3	6,7	6,3	21,2	10,9	10,3
16:1	6,3	5,8	5,3	5,9	6,0	5,9
18:0	6,0	2,2	1,9	7,7	--	6,0
18:1	28,5	20,0	18,1	15,6	17,4	18,1
18:2	46,9	53,6	52,8	22,9	46,7	46,9
18:3/20:1	3,9	2,8	2,8	--	--	2,8
20:4	--	9,0	12,8	26,7	19,0	12,8

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 29

FETTSÄURENMUSTER DER TRIACYLGLYCERINE DER LDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	1,6	--	--	1,2	--	--
15:0	--	--	--	1,6	--	--
16:0	22,4	12,9	10,9	17,5	13,2	13,2
16:1	4,0	4,2	4,0	2,6	4,7	4,0
18:0	4,3	4,0	2,4	3,3	3,2	3,3
18:1	24,7	20,4	15,5	23,6	23,3	23,3
18:2	31,5	25,0	24,1	28,8	20,9	25,0
20:0	--	2,0	1,5	1,3	2,0	1,5
18:3/20:1	2,3	2,0	1,6	1,5	--	1,6
20:4	9,3	21,8	22,0	15,2	23,2	21,9
20:5	--	7,7	13,3	3,5	7,1	7,1
22:5	--	--	2,3	--	2,5	--
22:6	--	--	2,5	--	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 30

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLCHOLINS DER LDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	1,6	--	--	--	--	--
16:0	22,4	23,8	18,0	30,9	15,7	22,4
16:1	4,0	--	--	--	--	--
18:0	4,3	41,4	39,4	50,2	31,8	39,4
18:1	24,7	10,5	8,3	7,5	9,5	9,5
18:2	31,8	17,5	15,9	11,4	13,2	15,9
18:3/20:1	1,9	--	--	--	--	--
20:4	9,4	6,8	18,3	--	29,8	9,4

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 31

FETTSÄURENMUSTER DES LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINS DER LDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0		2,2	--	--	--	--
16:0		39,3	31,2	34,0	35,2	34,6
16:1		--	--	7,6	4,7	2,4
18:0		58,5	68,9	49,0	53,2	55,9
18:1		--	--	9,5	6,8	3,4

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 32

FETTSÄURENMUSTER DES SPHINGOMYELINS DER LDL

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0		2,1			--	1,0
16:0		54,8			56,3	55,6
17:0		1,7			--	--
18:0		24,7			27,7	26,2
18:1		--			2,8	1,4
20:0		4,6			3,6	4,1
22:0		5,3			4,5	4,9
23:0		6,8			5,1	6,0

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 33

FETTSÄURENMUSTER DER CHOLESTERINESTER DER HDL₁

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0	8,6	9,1	6,7	18,1	7,2	8,6
16:1	3,2	3,0	2,9	3,0	2,8	3,0
18:0	1,7	--	--	--	--	--
18:1	15,7	13,6	12,6	17,8	14,0	14,0
18:2	51,5	61,2	59,2	41,7	46,3	51,5
18:3/20:1	--	3,9	1,9	--	--	--
20:4	14,4	9,3	16,8	6,0	29,7	14,4
24:0	--	--	--	5,0	--	--
24:1	4,8	--	--	8,4	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 34

FETTSÄURENMUSTER DER TRIACYLGLYCERINE DER HDL₁

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	11,7	5,3	4,8	6,9	11,8	6,9
15:0	6,7	5,5	5,6	5,4	5,9	5,6
16:0	34,7	42,3	41,0	34,3	34,6	34,7
16:1	9,5	11,0	9,8	11,6	10,4	11,0
17:1	--	3,5	3,7	--	2,7	2,7
18:0	4,4	7,1	7,7	7,7	5,6	7,1
18:1	23,3	25,5	25,5	25,0	23,4	25,0
18:2	--	--	2,0	9,1	5,7	2,0
n.i.	9,7					

Angaben in Gewichtsprozent
n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 35

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLCHOLINS DER HDL₁

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0	27,9	18,1	18,1	19,8	14,4	18,1
18:0	48,7	36,0	37,1	40,3	31,3	37,1
18:1	7,3	10,2	8,1	10,2	8,8	8,8
18:2	13,2	21,4	16,2	15,7	12,5	15,7
20:4	3,0	14,2	20,6	14,0	33,0	14,2

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 36

FETTSÄURENMUSTER DES LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINS DER HDL₁

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0		34,9	28,1	33,6	29,3	31,4
16:1		--	--	7,0	8,4	3,5
17:0		1,3	--	--	--	--
18:0		63,8	71,9	52,7	46,9	58,2
18:1		--	--	6,7	15,5	3,4

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 37

FETTSÄURENMUSTER DES SPHINGOMYELINS DER HDL₁

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\tilde{X}$
14:0		--	--	--	2,0	--
16:0		44,7	54,4	66,0	39,5	49,5
16:1		--	--	--	2,0	--
17:0		1,4	--	--	1,3	--
18:0		24,5	26,8	34,0	18,5	25,7
18:1		--	--	--	2,2	--
20:0		4,7	3,9	--	3,8	3,9
22:0		6,6	4,6	--	5,1	4,8
23:0		8,5	2,2	--	7,4	4,8
n.i.		--	--	--	5,9	--
24:0		4,1	1,9	--	12,4	3,0
24:1		5,6	6,3	--	--	2,8

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 38

FETTSÄURENMUSTER DER CHOLESTERINESTER DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\tilde{X}$
16:0	7,2	6,5	7,2	12,2	7,6	7,2
16:1	1,5	1,4	--	1,4	1,7	1,4
18:0	1,5	--	--	2,3	1,2	1,2
18:1	14,3	12,5	13,3	13,7	14,3	13,7
18:2	51,9	60,0	54,1	39,5	48,5	51,9
20:4	23,7	19,5	24,5	10,6	26,8	23,7
24:0	--	--	--	3,5	--	--
24:1	--	--	--	16,9	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 39

FETTSÄURENMUSTER DER TRIACYLGLYCERINE DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
14:0	4,5	--	7,9	1,5	5,0	4,5
15:0	2,1	--	6,2	1,8	2,8	2,1
16:0	24,4	20,4	31,9	18,4	23,5	23,5
16:1	6,0	4,6	10,5	3,2	9,0	6,0
17:1	--	--	3,1	--	1,9	--
18:0	5,5	7,7	7,5	5,7	5,9	5,9
18:1	22,9	26,4	23,7	19,6	23,3	23,3
18:2	10,8	26,9	6,6	21,0	17,2	17,2
18:3/20:1	--	4,6	2,7	2,1	--	2,1
20:4	--	6,4	--	15,6	8,5	6,4
n.i.	7,1	3,0	--	9,9	--	3,0
n.i.	16,7	--	--	--	3,0	--

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 40

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLCHOLINS DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	28,9	18,9	15,1	17,0	16,5	17,0
18:0	52,9	37,9	32,0	36,2	42,5	37,9
18:1	9,0	11,2	7,4	8,7	6,1	8,7
18:2	7,7	21,7	16,0	16,0	10,5	16,0
20:4	1,6	10,3	29,5	22,1	24,4	22,1

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 41

FETTSÄURENMUSTER DES LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINS DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0	28,5	30,3	29,6	20,1	20,8	28,5
17:0	--	1,5	--	--	--	--
18:0	61,3	59,9	60,0	43,5	59,9	60,0
18:1	5,0	5,3	4,7	8,2	5,6	5,3
18:2	3,3	3,0	3,3	12,5	4,8	3,3
20:4	1,9	--	2,5	15,8	8,7	2,5

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 42

FETTSÄURENMUSTER DES SPHINGOMYELINS DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
16:0	38,4	31,3	36,5	29,5	34,0	34,0
17:0	1,3	1,1	--	--	--	--
18:0	28,0	19,7	22,7	21,6	25,7	22,7
18:1	--	--	--	--	1,8	--
18:2	--	--	--	--	1,4	--
20:0	5,0	4,5	4,1	4,0	3,7	4,1
n.i.	--	1,5	--	--	--	--
22:0	8,1	7,4	7,1	8,1	5,3	7,4
20:4	--	2,6	--	--	--	--
23:0	10,5	9,1	8,0	8,7	8,5	8,7
n.i.	--	1,1	--	--	6,9	--
24:0	8,8	7,1	6,0	7,1	12,7	7,1
24:1	--	14,7	15,7	21,1	--	14,7

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 43

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLINOSITOLS DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	9,7	10,8	8,4	10,7	11,0	10,7
17:0	1,2	1,4	--	--	--	--
18:0	83,3	64,1	44,3	59,0	44,4	59,0
18:1	2,3	5,4	4,1	5,0	4,1	4,1
18:2	1,3	4,7	4,3	5,1	3,4	4,3
22:0	--	--	2,1	--	--	--
20:4	2,2	13,6	36,9	20,1	37,1	20,1

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 44

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLETHANOLAMINS DER HDL₂

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
15:0	--	1,9	1,3	--	--	--
16:0	20,6	16,7	12,7	21,5	15,7	16,7
17:1	3,4	5,0	2,8	--	1,7	2,8
18:0	40,4	34,4	24,3	36,3	22,6	34,4
18:1	8,6	8,3	4,6	7,5	7,5	7,5
18:2	9,2	8,4	6,2	8,9	5,3	8,4
20:4	14,6	17,1	24,2	25,8	23,7	23,7
n.i.	3,3	--	--	--	--	--
20:5	--	3,3	--	--	--	--
22:4	--	5,9	2,6	--	5,1	2,6
22:5	--	--	7,7	--	7,8	--
22:6	--	--	13,8	--	10,6	--

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 45

FETTSÄURENMUSTER DER CHOLESTERINESTER DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	5,7	5,6	6,8	13,8	6,8	6,8
16:1	2,6	1,5	3,1	1,3	2,0	2,0
18:0	1,1	--	--	1,8	--	--
18:1	13,0	12,1	12,5	12,1	12,7	12,5
18:2	48,4	57,1	51,6	29,2	43,3	48,8
20:4	29,3	23,6	26,1	8,7	35,3	26,1
24:0	--	--	--	5,9	--	--
24:1	--	--	--	27,3	--	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 46

FETTSÄURENMUSTER DER TRIACYLGLYCERINE DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
14:0	3,0	6,1	6,3	5,3		5,7
15:0	4,4	2,8	4,1	4,2		4,2
16:0	25,0	30,2	25,1	26,1		25,6
16:1	12,1	7,0	9,7	8,5		9,1
17:1	3,9	1,3	2,3	1,6		2,0
18:0	4,8	7,6	6,2	5,2		5,7
18:1	24,1	29,4	23,0	21,4		23,4
18:2	5,9	7,9	14,2	16,0		11,1
18:3/20:1	--	2,4	2,9	1,6		2,0
20:4	16,8	5,3	6,3	6,4		6,3
n.i.	--	--	--	3,7		--

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 47

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLCHOLINS DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	24,0	27,4	17,3	18,1	13,7	18,1
16:1	1,0	1,8	--	--	1,2	1,0
17:0	1,1	--	--	--	--	--
18:0	46,7	38,7	35,5	33,7	29,9	35,5
18:1	9,7	7,9	8,7	8,7	6,2	8,7
18:2	11,4	21,9	16,5	15,2	12,6	15,2
20:4	6,1	2,4	22,0	24,4	36,5	22,0

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 48

FETTSÄURENMUSTER DES LYSOPHOSPHATIDYLCHOLINS DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	34,4	36,1	35,5	34,4	31,5	34,4
16:1	1,2	1,4	--	--	--	--
17:0	1,2	1,2	--	--	--	--
18:0	50,4	42,0	48,1	45,0	44,4	45,0
18:1	6,6	7,5	6,9	6,8	6,1	6,8
18:2	6,1	9,6	7,4	9,9	7,9	7,9
20:4	--	2,2	2,2	4,0	10,1	2,2

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 49

FETTSÄURENMUSTER DES SPHINGOMYELINS DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{X}$
14:0	--	1,9	1,3	--	2,5	1,3
16:0	35,5	49,0	40,7	35,3	36,9	36,9
16:1	--	--	--	--	2,7	--
17:0	1,4	1,2	--	--	--	--
18:0	26,3	32,6	24,9	21,5	15,7	24,9
18:1	--	--	--	--	3,8	--
18:2	--	--	--	--	2,1	--
20:0	4,5	4,9	4,2	3,9	3,3	4,2
22:0	7,8	6,8	6,3	7,6	4,5	6,8
20:4	--	--	--	--	5,9	--
23:0	12,4	3,6	6,9	8,4	6,9	6,9
n.i.	--	--	--	--	5,7	--
24:0	10,2	--	5,0	6,2	10,1	6,2
24:1	2,0	--	10,8	17,1	--	2,0

Angaben in Gewichtsprozent

n.i.: nicht identifiziert

TABELLE 50

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLINOSITOLS DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
16:0	11,0		16,6	11,6	16,1	13,9
16:1	--		--	1,6	2,6	--
18:0	89,0		77,3	48,3	39,3	62,8
18:1	--		4,4	6,1	6,9	5,3
18:2	--		1,7	6,9	4,0	2,9
20:4	--		--	25,5	25,3	12,6
24:0	--		--	--	4,0	--

Angaben in Gewichtsprozent

TABELLE 51

FETTSÄURENMUSTER DES PHOSPHATIDYLETHANOLAMINS DES UZR

Fettsäure	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	$\bar{x}$
14:0	2,0		--	--	--	--
16:0	27,2		22,5	31,0	44,1	29,1
16:1	1,8		--	--	--	--
17:0	1,6		--	--	--	--
18:0	40,1		38,3	39,9	31,2	39,1
18:1	12,3		11,6	6,8	12,9	12,0
18:2	8,9		11,8	9,7	11,9	10,7
20:4	6,2		15,9	12,6	--	9,4

Angaben in Gewichtsprozent

Herrn Prof. Dr. H. Weik danke ich für die Überlassung des Themas und für die Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. M. Siegert und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der Elektrophoreseeinrichtungen und für die gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung danke ich Frau Kulschewski und Frau Wagner.

LEBENS LAUF

Name, Vorname Olejniczak, Klaus
Geburtstag 30. 12. 1945
Familienstand Verheiratet, 3 Kinder

Schulbildung

1952-1956 Primarschule Insel Reichenau
1956-1959 Primarschule Tägerwilen (Schweiz)
1959-1962 Sekundarschule Tägerwilen (Schweiz)

Beruflicher Werdegang

1962-1968 3 1/2 jährige Lehrzeit als Chemie-
laborant in der Fa. Degussa in Kon-
stanz. Nachfolgende Tätigkeit in mei-
ner Lehrfirma und der Fa. Geigy in
Basel.

1968-1971 3 jähriges Studium an der Akademie
Prof. Dr. Grübler in Isny (Allgäu),
Fachrichtung Chemie. Abschluß:
Diplom Ingenieur (FH).

1972-1973 1/2 Jahr als Chemiker in der Fa. Ciba-
Geigy in Basel tätig und 1/2 Jahr
Chemiestudium an der Universität
in Konstanz.

1973-1978 Veterinärmedizinisches Studium an der
Freien Universität in Berlin,
Approbation 1978.

1978-1983 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im
Institut für Veterinär-Biochemie an
der Freien Universität Berlin.

ab 1983 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im In-
stitut für Arzneimittel des Bundes-
gesundheitsamtes, Abteilung Toxikologie,
in Berlin.

